

Über die Bestimmung von Tryptophan an nativer und bestrahlter Lactatdehydrogenase

von

Willibald Metzger

aus

Agendorf

1976

1977 № 100



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543124_0076

Aus dem Institut für Radiologie
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. phil. nat. H. Pauly

Über die Bestimmung von Tryptophan an nativer und bestrahlter Lactatdehydrogenase

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
dem Fachbereich Medizin
der Friedrich - Alexander - Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt

von

Willibald Metzger

aus

Agendorf

Gedruckt mit Erlaubnis des Fachbereichs Medizin
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan:

Prof. Dr. E. Rügheimer

Referent:

Prof. Dr. Dr. H. Pauly

Tag der mündlichen Prüfung:

09. Dezember 1976

INHALTSÜBERSICHT

<u>1. Einleitung</u>	1
<u>2. Experimenteller Teil</u>	4
2.1. Materialien	4
2.1.1. Chemikalien	4
2.1.2. Geräte	5
2.2. Methoden	5
2.2.1. Allgemeines	5
2.2.2. Entsalzen der LDH-Kristallsuspension	6
2.2.3. Messung der LDH-Konzentration	6
2.2.4. Messung der Enzymaktivität	7
2.2.5. Bestrahlungsbedingungen und Dosimetrie	9
2.2.6. Tryptophanbestimmung	11
2.2.6.1. Methode nach Swinehart und Hess in Proteinen	11
2.2.6.2. Methode nach Spies und Chambers	12
<u>3. Ergebnisse</u>	15
3.1. Bestimmung von Tryptophan nach Swinehart und Hess	15
3.1.1. Spektrum von Riboflavin-5'-phosphat	15
3.1.2. Spektrum des Riboflavin-5'-phosphat- Tryptophan-Komplexes	15
3.1.3. Störfaktoren der Reaktion	17
3.1.4. Eichkurve	22
3.2. Bestimmung von Tryptophan nach Spies und Chambers	22
3.2.1. Spektrum bei freiem Tryptophan	22
3.2.2. Dauer von Reaktion I und Reaktion II bei LDH-M ₄	24

3.2.3. Spektrum bei LDH-M ₄	25
3.2.4. Eichkurve und Tryptophangehalt von LDH-M ₄	26
3.3. Tryptophanbestimmung bei bestrahlter LDH-M ₄	29
3.3.1. Tryptophanabbau bei Bestrahlung unter Stickstoff	29
3.3.2. Tryptophanabbau bei Bestrahlung unter N ₂ O	30
3.3.3. Tryptophanabbau bei Bestrahlung unter Luft	31
3.3.4. Abhängigkeit der Dauer von Reaktion I von der Dosis bei Bestrahlung unter Luft	34
<u>4. Diskussion</u>	38
<u>5. Zusammenfassung</u>	51
<u>6. Literaturverzeichnis</u>	52

1. Einleitung

Das Interesse an der biologischen Wirkung von ionisierenden Strahlen war seit der Entdeckung durch Röntgen (1895) und Becquerel (1896) sehr groß. Die Strahlenbiologie erlangte durch die stürmische Entwicklung von Kernenergie und Kerntechnik, sowie den mannigfaltigen Anwendungsmöglichkeiten von Strahlen in der Medizin und anderen Bereichen zunehmende Bedeutung.

Es wird allgemein akzeptiert, daß die weitreichendsten Schäden durch ionisierende Strahlen in Zellen an der DNS des Kerns gesetzt werden. Dennoch sind Enzyme wegen ihrer Wichtigkeit bei den Stoffwechselvorgängen von großem Interesse und ihre Spezifität stellt eine empfindliche Methode zur Feststellung der Inaktivierung durch ionisierende Strahlen dar. Die Strahlenchemie von biologischen Makromolekülen wird vor allem an Enzymen untersucht, deren Struktur und Eigenschaften bekannt sind und sie kann als Modell für den allgemeinen Mechanismus dienen, wonach Biomoleküle von inaktivierenden Teilchen angegriffen werden.

Nach Studien einer Vielzahl von physiko-chemischen Veränderungen, die durch Bestrahlung hervorgerufen werden, wird der Verlust der Aktivität einer Reihe von möglichen Faktoren zugeschrieben. Sie beinhalten die Zerstörung von Wasserstoffbrückenbindungen, die Spaltung von Disulfidbrücken, chemische Veränderungen an Aminosäuren des aktiven Zentrums, Modifikationen der Hauptkette und die Ausbildung neuer Bindungen (1).

Innerhalb derartig komplexer Vorgänge wurde immer wieder die Frage diskutiert, welche Rolle die Zerstörung einzelner Aminosäuren bei der Strahleninaktivierung von Enzymen spielen. Adelstein und Mee (2) und Sanner u. Pihl (3) sehen eine Abhängigkeit der Aktivität von SH-Gruppen bei Enzymen, die diese Gruppe im aktiven Zentrum enthalten. Andere

Autoren (4,5) messen dieselbe Bedeutung dem Tryptophan bei, wenn es als sog. essentieller Tryptophanrest an der enzymatischen Aktivität maßgeblich beteiligt ist.

Diese Erkenntnis wurde aus pulsradiolytischen Experimenten gezogen (6). Danach reagieren im Initialstadium alle OH-Radikale mit Tryptophan. OH-Radikale bewirken zugleich 90% der Inaktivierung (7).

Die Zerstörung von Tryptophan ist jedoch nicht die einzige Veränderung in der Aminosäurezusammensetzung eines Enzyms. Es wurde nachgewiesen, daß auch andere Aminosäuren bei der Bestrahlung abgebaut werden.

Für unsere Versuche wählten wir das Isoenzym LDH-M₄ aus Kaninchenskelettmuskel. Lactatdehydrogenase gehört zu den Enzymen, die Tryptophan vermutlich als essentiellen Rest besitzen.

In dieser Arbeit soll die Abhängigkeit der Strahleninaktivierung von LDH-M₄ von verschiedenen Gasbedingungen (N₂, N₂O, Luft) untersucht werden und deren Korrelation mit dem Abbau von Tryptophan nachgeprüft werden. Außerdem soll die Entfaltung als Veränderung der Tertiärstruktur der Moleküle aufgrund der Reaktivität nicht zerstörter Tryptophanmoleküle aufgezeigt werden. Es wird davon ausgegangen, daß sich bei nativer LDH einige Tryptophanreste an der Oberfläche des Moleküls befinden, während der überwiegende Teil, bestimmt durch die hydrophoben Eigenschaften von Tryptophan, im Inneren des Moleküls lokalisiert ist.

In einer Arbeit von E. Müller (8) konnte die Entfaltung in analoger Weise durch die Bestimmung "freier" SH-Gruppen nachgewiesen werden, und als Funktion von zunehmender Dosis und abnehmender enzymatischer Aktivität bestimmt werden. Eine Unterscheidung von dosisabhängiger Entfaltung und Aggregation von LDH-Molekülen, sowie eine Überprüfung des Tryptophangehaltes in den durch Gelchromatographie gefundenen verschiedenen Bestrahlungsprodukte (9) wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht getroffen.

Die Tryptophanbestimmung soll nach zwei verschiedenen Methoden vorgenommen werden. Die von Swinehart und Hess (10) vorgeschlagene Methode zur Tryptophanbestimmung und zur Unterscheidung von "buried and exposed" Tryptophanmolekülen soll zunächst auf ihre Empfindlichkeit und die Eignung für die Versuche überprüft werden. Als zweite Nachweismethode wird die Standardmethode nach Spies und Chambers zur Bestimmung von freiem (11) und proteingebundenem Tryptophan (12) benutzt. Die Nachweismethoden, die auf einer (alkalischen) Hydrolyse beruhen, können in dieser Arbeit nicht zur Anwendung kommen, da dabei neben der Zerstörung der Proteinstuktur eine erhebliche Zerstörung von Tryptophan zu erwarten ist.

2. Experimenteller Teil

2.1. Materialien

2.1.1. Chemikalien

An Chemikalien wurden verwendet:

von der Fa. Böhringer u. Söhne GmbH, Mannheim:

- Lactatdehydrogenase ⁽¹⁾ aus Kaninchenskelettmuskel (Kristallsuspension in 3,2 M Ammoniumsulfat)
- β -Nikotinamid-adenin-dinukleotid ⁽²⁾ (als reduzierte Form, Di-Natriumsalz 80%ig)
- Pyruvat (Mono-Natriumsalz)

von Serva Entwicklungslabor Heidelberg:

- L-tryptophan ⁽³⁾
- para-Dimethylaminobenzaldehyd ⁽⁴⁾
- Riboflavin-5'-phosphat ⁽⁵⁾ (als Mono-Natriumsalz)

von der Fa. Merck AG, Darmstadt

- 98%ige Schwefelsäure zur Stickstoffbestimmung
- Natriumnitrit (kristallisiert)
- sowie alle übrigen Chemikalien

von der Fa. Pharmacia, Uppsala:

- Sephadex G-25 fine

Das verwendete Wasser war entionisiert und zweifach quarzdestilliert.

Abkürzungen:

(1) LDH - M₄

(2) NADH

(3) Trp

(4) PDAB

(5) R-5'-P

2.1.2. Geräte

Folgende Geräte wurden benutzt:

- Therapie-Röntgenröhre TR 300 f; Siemens, Erlangen
- Kälte-Thermostat Ultra Kryomat TK 30; Wobser, Lauda
- Spektralphotometer PMQ II; Carl Zeiss, Oberkochen
- Quarz-Suprasil und -Infrasil-Küvetten, Schichtlänge 1 cm; Hellma, Müllheim
- Küvetten aus optischem Spezialglas, Schichtlänge 2 cm; Hellma, Müllheim
- Mikropipetten Marburg; Eppendorf Gerätebau, Hamburg
- pH-Meter 27; Radiometer, Kopenhagen
- Gasmonitor und pO_2 -Elektrode; Radiometer, Kopenhagen
- Fraktionssammler LKB Ultro Rac; LKB Producter, Stockholm
- Plexiglas-Chromatographierohr (60 cm lang, $\varnothing$ 1,4 cm)
- Bestrahlungstopf - nach Plänen angefertigt in der Werkstatt des Institutes
- Optilab-Analog-Digital-Wandler Multilog 801
- Optilab Printer Driver 833, und
- Optilab Präzisions Timer 825; Optilab und Bo Philip, Instrumentation AB Vällingby, Schweden

2.2. Methoden

2.2.1. Allgemeines

Um eine möglichst weitgehende Keimarmut zu erreichen, wurden alle Glaswaren (Bestrahlungstopf, Reaktionsgläser, Meßkölbchen, Pipetten usw.) vor Gebrauch mit 70%igem Methanol desinfiziert. Die verwendeten Puffer und Sephadex G-25 fine wurden 20 Minuten bei 120°C sterilisiert und bei 4°C aufbewahrt. Die 3,2 M Ammoniumsulfat-Kristallsuspension wurde ebenfalls bei 4°C gelagert. L-Tryptophan und die Tryptophannachweisreagentien Riboflavin-5'-Phosphat und PDAB wurden bei der selben Temperatur und unter Lichtausschluß aufbewahrt, um eine Zerstörung durch Licht und Wärme - wie sie

besonders bei Riboflavin-5'-phosphat auftritt - auszuschließen. Natriumnitrit mußte vor Feuchtigkeit geschützt werden.

2.2.2. Entsalzen der LDH-Kristallsuspension

LDH-M₄ wurde als Kristallsuspension in 3,2 M Ammoniumsulfat bezogen. Die Konzentration an LDH-M₄ in dieser Suspension betrug 10 mg/ml. Zur Entsalzung wurde eine LDH-M₄-Lösung auf eine Chromatographiesäule (60 cm lang, Ø 1,4 cm) mit Dextrangel Sephadex G-25 fine aufgetragen und mit dem gewünschten Puffer eluiert. Die aufgetragene Enzymlösung bestand aus 5 ml der Kristallsuspension und 5 ml 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7, welcher zugleich als Elutionsmittel diente. Das Eluat wurde in Fraktionen von je 3 ml (45 Tropfen) gesammelt. Der Vorgang des Entsalzens wurde unter Kühlung bei 1,5°C durchgeführt, um eine Denaturierung des Proteins auszuschließen.

Mit Neßler's Reagens wurden die einzelnen Fraktionen durchgetestet, ob sie frei von Ammoniumsulfat waren. Die ammoniumsulfatfreien Fraktionen wurden spektrophotometrisch bei 280 nm auf ihren Proteingehalt überprüft. Die höher konzentrierten Lösungen wurden zusammengegeben und die dabei erhaltene Konzentration bestimmt. Dann wurde mit Na-Phosphatpuffer so verdünnt, daß man eine LDH-Konzentration von 1 mg/ml erhielt.

2.2.3. Messung der LDH-Konzentration

Die Bestimmung der Konzentration der hochkonzentrierten LDH-Lösung erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm in 1 cm Küvetten. Sie basierte auf dem Extinktionskoeffizienten einer 0,1%igen LDH-Lösung, von $\epsilon_{280} = 1,44 \text{ ml} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, welcher der Literatur entnommen wurde (13).

Von der Proteinlösung unbekannter Konzentration wurden 0,1 ml mit 3 ml Na-Phosphatpuffer (0,1 M; pH 7) verdünnt und gegen einen Leerwert, der nur Puffer enthielt, ausgemessen. Die Konzentration des Meßwertes an LDH wurde nach folgender Formel berechnet:

$$C = \frac{E_{280} \cdot 31}{1 \cdot \epsilon_{280}} \quad \text{mg/ml}$$

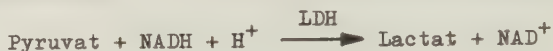
Dabei ist E_{280} die abgelesene Extinktion und 31 der Verdünnungsfaktor. Für die Versuche wurde eine LDH-Konzentration von 1 mg/ml verwendet. Um diesen Wert zu bekommen, wurde berechnet, welche Menge der hochkonzentrierten Proteinlösung benötigt wurde, um 10 ml der gewünschten Konzentration zu ergeben. Die erhaltene Menge wurde in das Meßkölbchen pipettiert und mit Na-Phosphatpuffer auf 10 ml aufgefüllt und vorsichtig vermischt.

2.2.4. Messung der Enzymaktivität

Zur Messung der enzymatischen Aktivität von LDH diente der von Warburg (14) entwickelte photometrische Test. Er beruht darauf, daß das Coenzym NADH, welches an der von LDH katalysierten Reaktion beteiligt ist, bei 340 nm ein Absorptionsmaximum aufweist, während die oxydierte Form NAD^+ bei dieser Wellenlänge kein Licht absorbiert. Die zeitlich erfaßbare Abnahme der Absorption von Coenzym ist dabei in direkte Relation zur umgesetzten Menge an LDH zu setzen. Die Berechnung erfolgt mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten von NADH bei 340 nm. Er beträgt bei 25°C $6,22 \text{ cm}^2 \cdot \mu\text{Mol}^{-1}$ (15). Zu berücksichtigen waren für die folgende Gleichung (15) außer der Extinktionsänderung pro Minute ($\Delta E/\text{min}$) noch das Ansatzvolumen ($V = 3,12 \text{ ml}$), das Probevolumen ($v = 0,02 \text{ ml}$) und die Proteinkonzentration ($c = \text{mg/ml}$) der Untersuchungslösung.

$$\frac{V \cdot \Delta E / \text{min}}{6,22 \cdot v \cdot c} = \text{IU} \cdot \text{mg}^{-1} = \text{spezifische Aktivität}$$

Das Gleichgewicht der Reaktion, bei der Pyruvat durch LDH zu Lactat reduziert wird, liegt bei 25°C mit einer Konzentration von $3,6 \cdot 10^{11}$ auf der Seite der Lactatbildung



Die Aktivitätsmessung für eine Eichkurve von LDH und die Dosis-Effekt-Kurven nach den Bestrahlungsversuchen wurden mit folgendem Testansatz durchgeführt:

3,00 ml M/15 Na-Phosphatpuffer pH 7,4

0,05 ml NADH (7,1 mg/ml in 1% NaHCO_3)

0,02 ml Enzymverdünnung

0,05 ml Pyruvat (8,6 mg/ml in H_2O)

Die Reaktion wurde mit Pyruvat gestartet und bei Zimmertemperatur durchgeführt. Die Lösungen von NADH und Pyruvat wurden bis zur Benutzung nicht länger als eine Woche bei 4°C aufbewahrt.

Die Extinktionsabnahme von NADH wurde über 90 Sekunden im Abstand von 10 Sekunden gemessen, oder mit dem Optilab-System in Intervallen von 5 Sekunden registriert. Durch Auftragen der erhaltenen Werte und Anlegen einer Geraden mit errechneter Steigerung wurde $\Delta E/\text{min}$ ermittelt.

Die Konzentration an LDH-M₄ betrug in den Ansätzen zur Erstellung der Eichkurve 0,03 - 0,3 µg/ml und für die Dosis-Effekt-Kurven 0,25 µg/ml.

Als 100% Aktivität für LDH-M₄ ergab sich ein Wert von 540 IU/mg.

2.2.5. Bestrahlungsbedingungen und Dosimetrie

Bestrahlt wurden jeweils 10 ml einer LDH-M₄-Lösung mit einer Konzentration von $1 \pm 0,1$ mg/ml. Die Versuche wurden mit einem Röntgengerät bei 200 kV Röhrenspannung und 20 mA Röhrenstrom durchgeführt, die Eigenfilterung der Röhre entsprach 2 mm Aluminium.

Die Dosismessung wurde physikalisch mit Ionisationskammern vorgenommen und durch Integration ein Wert von 2,17 krd/min in der Mitte des Probenvolumens festgestellt⁽¹⁾. Die Mitte des Probenvolumens hatte vom Fokus einen Abstand von 130 mm.

Während der Bestrahlung befand sich die Proteinlösung in einem Quarztöpfchen(siehe Abb. 1), in dem die Schichtdicke der Lösung 10 mm betrug. Bis zu dieser Höhe war das Töpfchen mit Kühlwasser umgeben, welches durch einen Kryostaten umgewälzt und bei einer Temperatur von 4°C konstant gehalten wurde. Es hatte eine Zuleitung für das Bestrahlungsgas und einen Stutzen zur Probenentnahme. Die Öffnung des Töpfchens war während der Bestrahlungsversuche mit einer 0,3 mm dicken Hostaphanfolie verschlossen. Die Lösung wurde während der Überleitung von Gas und während der Bestrahlung mit einem teflonbeschichteten Magnetprüher durchmischt, um eine schnelle Verdrängung des Sauerstoffs aus der Lösung und eine gleichmäßige Dosisverteilung zu erreichen. Zwischen dem Magnetprühergerät und dem Quarztöpfchen befand sich eine 18 mm dicke Plexiglasschicht, welche zusammen mit dem Kühlwasser eine Rückstreuung von den Metallteilen des Prühergerätes verhindern sollte.

Die Bestrahlungsversuche wurden unter drei verschiedenen Gasbedingungen durchgeführt. Für die erste Versuchsreihe verwendeten wir Stickstoff (N₂), welcher vor der Bestrahlung 2 Stunden über die Lösung geleitet wurde, um störenden Luft-sauerstoff zu entfernen. In den Proben herrschte danach ein

(1) Die Dosismessung wurde dankenswerter Weise von Herrn Dipl.-Phys. Dr. Milbers durchgeführt.

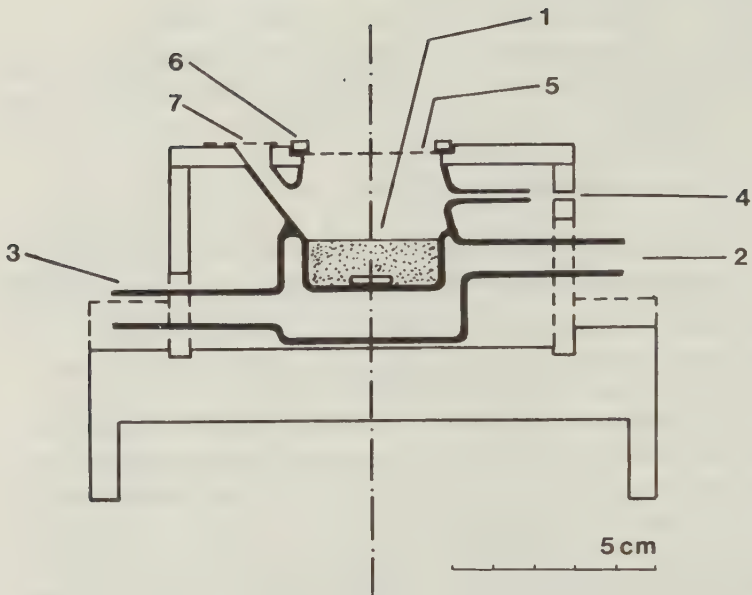


Abb. 1 Darstellung des Bestrahlungsgefäßes im Schnitt.

- 1 = Quarztöpfchen mit Probe und Rührer,
- 2 = Kühlmittelabfluß,
- 3 = Kühlmittelzufluß,
- 4 = Gaszuleitung,
- 5 = Hostaphanfolie,
- 6 = Klemmring,
- 7 = Öffnung für Probenentnahme und Gasausleitung.

Sauerstoffpartialdruck von 15 mm Hg, entsprechend $3,8 \cdot 10^{-5}$ Mol O_2 / 1 H_2O . Vor den Versuchen unter Stickoxydul (N_2O) wurde dieses Gas 90 Minuten in das Bestrahlungstöpfchen geleitet, bei ständiger Durchmischung der Probenlösung, und entsprach danach einer Konzentration von 0,03 Mol/l. Für die Versuche mit luftgesättigten Lösungen war eine Durchmischungszeit von 30 Minuten nötig. Die Sauerstoffkonzentration erreichte einen Wert von 0,002 Mol/l.

Genauere Angaben zu den Probenentnahmen und den applizierten Dosen bei den jeweiligen Gasbedingungen sind dem Ergebnisteil an den entsprechenden Stellen zu entnehmen.

2.2.6. Tryptophanbestimmung

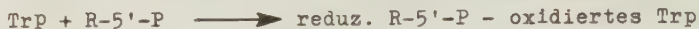
2.2.6.1. Methode nach Swinehart und Hess in Proteinen

Diese Methode der Tryptophanbestimmung beruht auf der von Isenberg und Szent-Györgyi (16) 1958 beschriebenen Reaktion von Riboflavin-5'-phosphat mit freiem Tryptophan in wässrigen Lösungen. Swinehart und Hess (10) benutzten diese Reaktion erstmals zur quantitativen Bestimmung von Tryptophan in Proteinen. Da Riboflavin-5'-phosphat mit Tryptophanresten im nativen Protein reagiert, konnten sie mit Hilfe dieser Methode zwischen Tryptophanresten unterscheiden, die sich an der Oberfläche des nativen Proteins befinden und - nach teilweiser oder totaler Zerstörung der Proteinstruktur - solchen, die aufgrund der hydrophoben Eigenschaft von Tryptophan im Inneren des Proteinmoleküls lokalisiert waren.

Riboflavin-5'-phosphat bildet mit Tryptophan bei Zimmertemperatur und neutralem pH einen 1 : 1 Komplex mit einem Absorptionsmaximum bei 500 nm. Bei einer Tryptophankonzentration von 10^{-2} M und einer Riboflavin-5'-phosphat-Konzentration von 10^{-3} M bildet sich eine rote Farbe, die dem Komplex zuzuschreiben ist. Der selbe Effekt ist bei tryptophan-

haltigen Protein, in entsprechend hoher Konzentration, zu beobachten.

Riboflavin-5'-phosphat liegt im erwähnten Komplex in einer Semichinonform vor. Als Semichinon ist Riboflavin normalerweise nur in starken Säuren beständig (16). Sie wird jedoch bei neutralem pH auch von Tryptophan erzeugt und stabilisiert.



Die Versuche mit Riboflavin-5'-phosphat wurden in 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7 durchgeführt. Für die photometrische Auswertung der Tryptophankonzentration wurden ein Meßwert und ein Kontrollwert benötigt.

In zwei 10 ml-Meßkölbchen wurden je 1 ml einer $1 \cdot 10^{-2}$ M Riboflavin-5'-phosphatlösung in Puffer einpipettiert. Dazu wurde in den Meßwert die gewünschte Menge von Tryptophan gegeben. Beide Ansätze wurden mit Puffer auf 10 ml aufgefüllt. Die Ansätze konnten sofort bei 500 nm ausgemessen werden.

Um die Reaktion empfindlicher zu machen wurde eine andere Gruppe von Experimenten durchgeführt. Dazu wurden 1 ml von $1 \cdot 10^{-3}$ M Tryptophan gelöst in Puffer, in das Meßkölbchen pipettiert und die Riboflavin-5'-phosphat-Konzentration in Vergleichs- und Testansatz variiert.

2.2.6.2. Methode nach Spies und Chambers

Aromatische Aldehyde reagieren in der Gegenwart von starken Säuren mit Tryptophan. Spies und Chambers (11,12) verwendeten für ihre Methode p-Dimethylaminobenzaldehyd (PDAB) gelöst in H_2SO_4 . Bei der anschließenden Oxidation mit Natriumnitrit tritt eine Blaufärbung des Reaktionsansatzes auf, der dabei entstandene Komplex zeigt ein Absorptionsmaximum bei 590 nm.

Spies und Chambers (11,12) unterscheiden zwei Reaktionsschritte. Als Reaktion I wurde die Reaktion von Tryptophan mit PDAB in H_2SO_4 bezeichnet, Reaktion II war die anschließende Oxidation mit Natriumnitrit. Beide Reaktionen sind zeitabhängig. Reaktion I läuft bei freiem Tryptophan in einer Stunde ab, während Reaktion II nach 30 Minuten beendet ist. Bei proteingebundenem Tryptophan ist die Reaktionszeit von RI von Protein zu Protein verschieden. Spies und Chambers (12) untersuchten 11 Proteine, jedoch nicht LDH.

Das Farbmaximum war je nach Protein in 3 - 24 Stunden erreicht. Der Komplex von freiem Trp und PDAB erwies sich über 72 Stunden stabil, es trat keine Abnahme der Extinktionsmaxima auf. Bei proteingebundenem Trp trat bereits nach 60 Minuten ein Verlust von rund 2% auf. Die Zeit für Reaktion II betrug im Mittel 60 Minuten.

Für die Versuche mußte ferner beachtet werden, daß beide Reaktionen unter Lichtabschluß stattfinden mußten und die Ansätze nach dem Anfertigen auf Zimmertemperatur gekühlt wurden.

Die Schwefelsäure (98%ig) mußte analysenrein und für Stickstoffbestimmung geeignet sein, da sich mit anderer Schwefelsäure, die mehr Verunreinigungen, wie z.B. Metallionen enthielt, niedrigere Extinktionsmaxima oder unerwartete Farbreaktionen ergaben. Für die Analyse mußte die 98%ige H_2SO_4 mit entionisierten und doppeltquarzdestilliertem Wasser nach Spies und Chambers auf die für die Reaktion optimale Konzentration von 67% verdünnt werden.

PDAB wurde darin gelöst und hatte eine Konzentration von 3,32 mg/ml. Für die Ausmessung der Spektren, die Aufstellung der Eichkurven und die quantitative Trp-Bestimmung von bestrahlter und nativer LDH wurden verschiedene Ansätze benutzt. Sie werden bei den Ergebnissen aufgeführt.

Die Konzentration von $NaNO_2$ betrug 0,045% gelöst in H_2O . Zur photometrischen Bestimmung bei 590 nm wurden ein Meß- und ein Kontrollansatz angefertigt. Der Meßwert enthielt

PDAB gelöst in H_2SO_4 und die auszumessende Menge Trp bzw. LDH. Im Leerwert befanden sich Trp bzw. LDH und 67%ige H_2SO_4 jedoch kein PDAB. Nach Ablauf von Reaktion I wurden beide Ansätze mit NaNO_2 versetzt.

3. Ergebnisse

3.1. Bestimmung von Tryptophan nach Swinehart und Hess

3.1.1. Spektrum von Riboflavin-5'-phosphat

Die Grundlage dieser photometrischen Trp-Bestimmungsmethode bildet die unterschiedliche Absorption des Riboflavin-5'-phosphats gegenüber dem Riboflavin-Tryptophan-Komplex bei 500 nm (16).

Um festzustellen, welche Absorption freies Riboflavin-5'-phosphat bei dieser Wellenlänge aufweist, wurde das Spektrum von Riboflavin-5'-phosphat in einem Bereich von 300 - 600 nm ausgemessen.

Riboflavin-5'-phosphat wurde in 0,1 M Na-Phosphatpuffer pH 7 gelöst, und die Extinktion gegen einen Leerwert, der nur Puffer enthielt, gemessen. Spektren wurden mit Riboflavin-5'-phosphat-Konzentrationen von $0,2 \cdot 10^{-5}$ und $0,5 \cdot 10^{-5}$ Mol/l aufgenommen. Sie zeigten einen übereinstimmenden Kurvenverlauf mit Absorptionsmaxima bei 375 nm und 445 nm (Abb. 2). Beim Maximum bei 445 nm nahm die Extinktion zu höheren Wellenlängen hin ab und verlief ab 550 nm in der Nulllinie. Bei 500 nm wurden Extinktionswerte von 0,07 bzw. 0,1 festgestellt.

Um bei der Bestimmung von Tryptophan solche Restextinktionen von freiem Riboflavin-5'-phosphat auszuschließen, wurde bei diesen Versuchen Riboflavin-5'-phosphat im Leerwert mitgeführt.

3.1.2. Spektrum des Riboflavin-5'-phosphat-Tryptophan-Komplexes

Dieses Spektrum wurde zur Prüfung der Reproduzierbarkeit des Absorptionsmaximums des Komplexes bei 500 nm in einem Wellenlängenbereich von 450 - 600 nm ausgemessen.

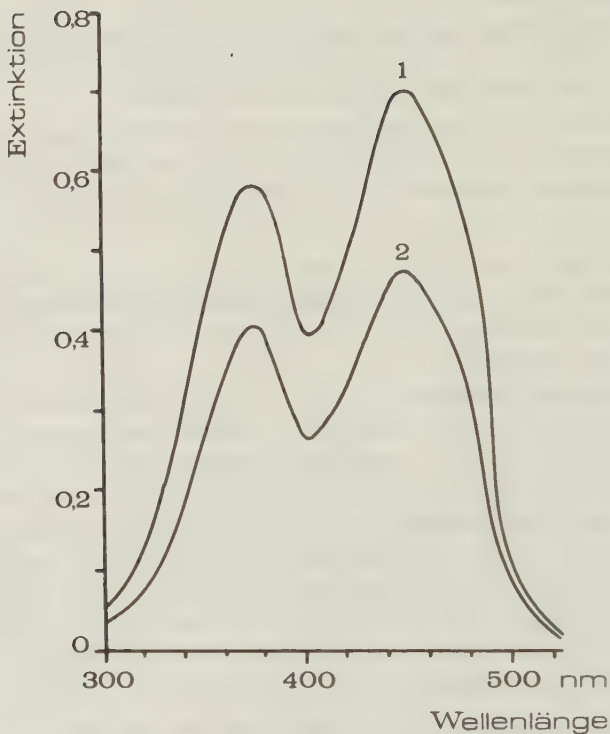


Abb. 2 Absorptionsspektrum von Riboflavin-5'-Phosphat.

Kurve 1: Extinktion von $0,5 \cdot 10^{-5}$ Mol/l in
0,1 M Na-Phosphatpuffer, pH 7, gegen
Leerwert ohne Riboflavin-5'-Phosphat
gemessen.

Kurve 2: Konzentration von Riboflavin-5'-Phosphat:
 $0,2 \cdot 10^{-5}$ Mol/l.

Dazu wurde eine Stammlösung von Riboflavin-5'-phosphat in 0,1 M Na-Phosphatpuffer pH 7 mit einer Konzentration von $1,1 \cdot 10^{-3}$ Mol/l zubereitet und mit demselben Puffer eine Lösung von Tryptophan mit einer Konzentration von $1 \cdot 10^{-2}$ Mol/l.

Es wurden Spektren mit verschiedenen Tryptophankonzentrationen und konstanter Riboflavin-5'-phosphat-Konzentration aufgezeichnet. Die Trp-Konzentration variierte von $1 \cdot 10^{-3}$ - $8 \cdot 10^{-3}$ Mol/l, die Riboflavin-5'-phosphat-Konzentration betrug $1,1 \cdot 10^{-4}$ Mol/l.

Die Test- und Kontrollansätze wurden wie im experimentellen Teil unter 2.2.6.1. angeführt zubereitet.

Der Testansatz enthielt 1 ml der Riboflavin-5'-phosphat-Stammlösung. Dazu wurde die gewünschte Menge an Tryptophan pipettiert und mit Puffer auf 10 ml aufgefüllt. Der Kontrollansatz bestand aus 1 ml Riboflavin-5'-phosphatlösung und Puffer.

Das Spektrum (Abb. 3), das nach Isenberg und Szent-Györgyi ein Absorptionsmaximum bei 500 nm hat (16), erwies sich bei wiederholten Messungen und gleichen Bedingungen als äußerst inkonstant. So stellte sich bei diesem Maximum eine Streubreite von ± 30 nm ein. Die gleiche Streubreite zeigte sich beim Übergang von positiven zu negativen Extinktionswerten, mit einem Mittelwert bei 460 nm.

3.1.3. Störfaktoren der Reaktion

Bei der Ermittlung von Faktoren, die die Nachweisreaktion ungünstig beeinflussen, stellte sich die Lichtempfindlichkeit des Riboflavin-5'-phosphats als der wichtigste heraus.

In einer Arbeit von L. J. Demerre und W. S. Brown (17) wurde die Einwirkung verschiedener Lichtqualitäten auf Riboflavin genauer untersucht. Unsere Untersuchungen beschränkten sich auf Tageslichtverhältnisse, wie sie im Labor herrschten. Getestet wurde dabei, inwieweit sich unterschiedlich lange

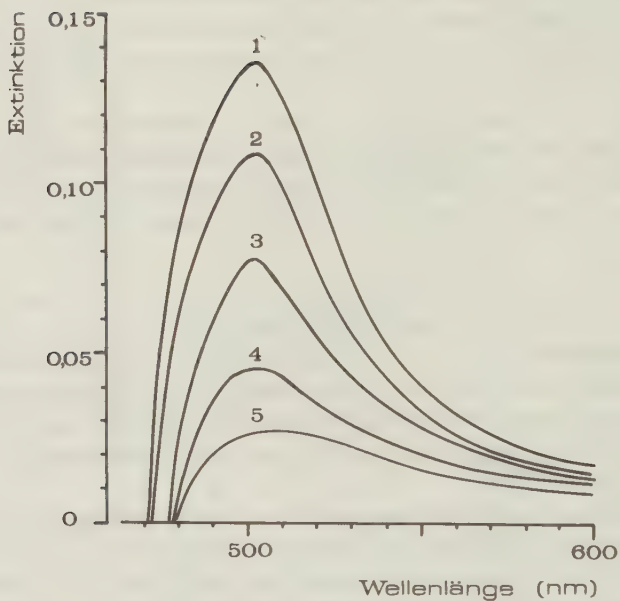


Abb. 3 Absorptionsspektrum des Riboflavin-5'-Phosphat-Tryptophan-Komplexes:
Konzentration von R-5'-P in Meß- und Leerwerten:
 $1,1 \cdot 10^{-4}$ Mol/l

Kurve 1: Trp-Konzentration: $8 \cdot 10^{-3}$ Mol/l
Kurve 2: " : $6 \cdot 10^{-3}$ Mol/l
Kurve 3: " : $4 \cdot 10^{-3}$ Mol/l
Kurve 4: " : $2 \cdot 10^{-3}$ Mol/l
Kurve 5: " : $1 \cdot 10^{-3}$ Mol/l

Einwirkungszeiten von Licht auf Riboflavin-5'-phosphat-Lösung bei der Ermittlung des Spektrums des Riboflavin-Trp-Komplexes auswirkten. (Abb. 4)

Riboflavin-5'-phosphat-Lösung wurde Licht bis zu 140 Minuten ausgesetzt. Alle 10 Minuten wurden Proben entnommen und mit diesen die Nachweisreaktion für Trp durchgeführt. Die dabei erhaltenen Spektren wiesen mit zunehmender Lichtexposition deutlicher werdende Unterschiede zum Spektrum auf, wie es unter Lichtabschluß festgestellt wurde.

Negative Werte, wie sie sich normalerweise bei 450 nm einstellten, wurden im gemessenen Wellenlängenbereich nicht mehr beobachtet.

Unabhängig von der Länge der Lichtexposition hatten die Spektren zwei Extinktionsmaxima, bei 450 nm und 500 nm. Die Höhe der Maxima dagegen war abhängig davon, in welcher Weise die Extinktionswerte des Maximums bei 450 nm mit zunehmender Lichtexposition größer wurden und die Werte für das zweite Maximum abnahmen.

Nach zweistündiger Lichtexposition wichen die erhaltenen Spektren kaum mehr voneinander ab. L. J. Demerre und W. S. Brown (17) zeigten, daß nach dieser Zeit nahezu die gesamte Menge an Riboflavin verändert ist.

Kontrollversuche mit nicht lichtexponiertem Riboflavin-5'-phosphat ergaben, daß die Lösung unbedenklich bis zu 3 Tagen nach Zubereitung verwendet werden konnte.

Unter Lichtausschluß durchgeführte Versuche mit Puffern unterschiedlicher Ionenstärke zeigten, daß diese keinen Einfluß auf die Reaktion hatten.

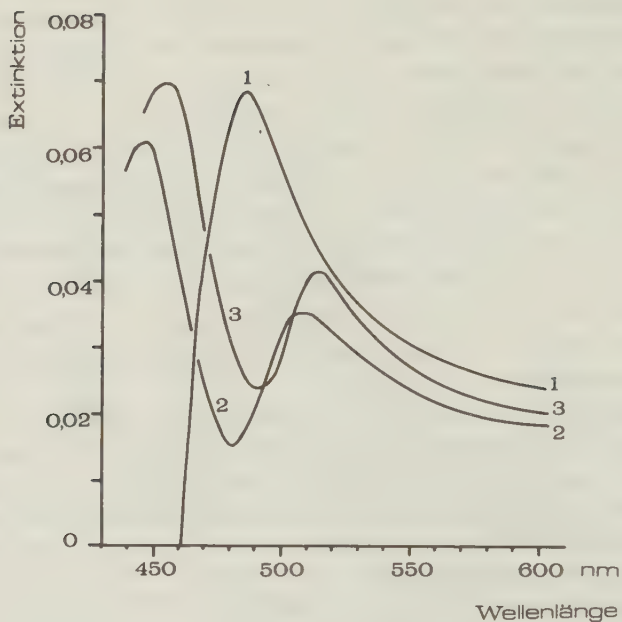


Abb. 4 Absorptionsspektrum des Riboflavin-5'-Phosphat-Tryptophan-Komplexes bei Lichtexposition.
Konzentration von Riboflavin-5'-Phosphat:
 $2,2 \cdot 10^{-4}$ Mol/l.
Konzentration von Tryptophan:
 $4 \cdot 10^{-4}$ Mol/l.
Kurve 1: keine Lichtexposition
Kurve 2: Lichtexposition: 70 Minuten
Kurve 3: " : 100 Minuten

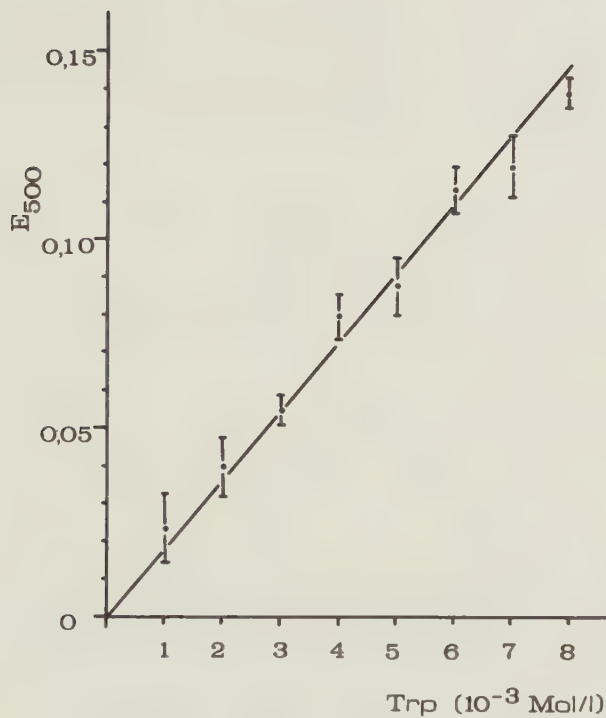


Abb. 5 Eichkurve von Tryptophan.
Konzentration von Riboflavin-5'-Phosphat:
 $1 \cdot 10^{-4} \text{ Mol/l}$.

3.1.4. Eichkurve

Zur Überprüfung der Genauigkeit der Tryptophan-Bestimmung mit Riboflavin-5'-phosphat wurden Eichkurven angefertigt, unter Ausschaltung der gefundenen Störfaktoren. Dazu wurde von einer $1 \cdot 10^{-2}$ M Tryptophan-Lösung in 0,1 M Natrium-phosphat-Puffer pH 7 eine Verdünnungsreihe von 0,1 - $1 \cdot 10^{-2}$ M hergestellt.

Der Meßansatz wurde wie folgt zubereitet:

1 ml Tryptophan-Verdünnung

1 ml $1 \cdot 10^{-4}$ M Riboflavin-5'-phosphat-Lösung
mit Puffer aufgefüllt auf 10 ml

Gemessen wurde gegen einen Kontrollansatz mit:

1 ml $1 \cdot 10^{-4}$ M Riboflavin-phosphat-Lösung
mit Puffer aufgefüllt auf 10 ml

Durch Auftragen der Tryptophan-Konzentration auf der Abszisse und der gemessenen Extinktion auf der Ordinate wurde unter Verwendung der Mittelwerte mehrerer Messungen eine Eichkurve, wie aus Abb. 5 ersichtlich, erhalten.

Die Mittelwerte für die Kurvenpunkte wurden nach $\bar{x} = \frac{\sum x_n}{n}$ errechnet und daraus mittels linearer Regression die Gerade $y = mx + b$ ermittelt.

3.2. Bestimmung von Tryptophan nach Spies und Chambers

3.2.1. Spektrum bei freiem Tryptophan

Das Spektrum wurde photometrisch ausgewertet, nachdem die Reaktion von Tryptophan mit PDAB (Reaktion I) und die Reaktion dieses Produkts mit Natriumnitrit (Reaktion II) beendet war. Die Zeiten, die für die Abläufe der beiden

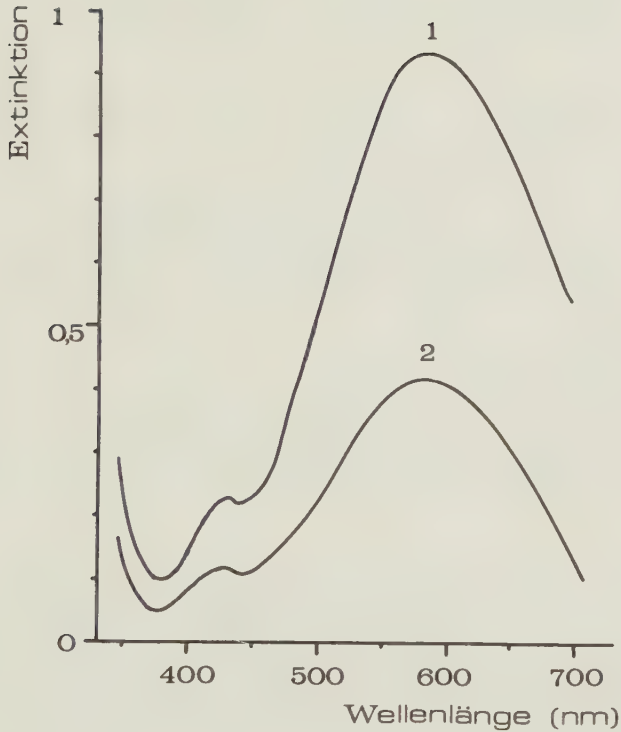


Abb. 6 Absorptionsspektrum des PDAB-Tryptophan-Komplexes
nach Oxidation mit Natriumnitrit.

Kurve 1: Tryptophankonzentration: 200 mg/l

Kurve 2: LDH-M₄-Konzentration: 1,25 g/l

Der Meßwert (PDAB-Konzentration: 0,33 mg/l) wurde
gemessen gegen einen Leerwert ohne PDAB.

Konzentration von Natriumnitrit: 0,04 g/l

Reaktionen nötig waren, wurden der Literatur (18) entnommen. Danach war Reaktion I nach 60 Minuten und Reaktion II nach 30 Minuten beendet. Sie wurden bei Zimmertemperatur und unter Lichtausschluß durchgeführt.

Folgende Ansätze wurden verwendet:

Meßansatz:

Reaktion I: 4 ml H_2SO_4 (67 %)

13,3 μg PDAB

0,5 ml Tryptophan-Lösung

Reaktion II: 0,05 ml NaNO_2 (0,04 %)

Kontrollansatz:

Reaktion I: 4 ml H_2SO_4 (67 %)

0,5 ml Tryptophan-Lösung

Reaktion II: 0,05 ml NaNO_2 (0,04 %)

Tryptophan war in 0,1 M Na-Phosphatpuffer pH 7 gelöst und hatte eine Konzentration von 0,2 mg/ml Lösung. Es wurde 67%ige H_2SO_4 und 0,04%iges NaNO_2 verwendet.

Das Spektrum wurde in einem Wellenbereich von 350 - 700 nm aufgezeichnet. Der Kurvenverlauf weist ein Absorptionsmaximum bei 590 nm auf, mit einer Streubreite von ± 5 nm (Abb.6: Kurve 1)

3.2.2. Dauer von Reaktion I und Reaktion II bei LDH-M₄

Um eine Tryptophanbestimmung nach Spies und Chambers bei LDH durchführen zu können, mußte zunächst die Dauer von Reaktion I und Reaktion II bestimmt werden, da sie bisher noch nicht gemessen wurde. Die Ansätze für Meß- und Leerwert wurden in 20 mm Meßküvetten, wie in 3.2.1. beschrieben, hergestellt. An Stelle des Tryptophans befand sich

in den Ansätzen 0,5 ml LDH-Lösung in 0,1 M Na-Phosphatpuffer pH 7 mit einer Konzentration von 0,1 mg/ml. Für den Zeitraum der Erfassung der Reaktionen blieben die Ansätze im lichtundurchlässigen Probenwechsler des Spektrometers.

Bei Reaktion I wurde gefunden, daß das dabei entstandene Reaktionsprodukt in einem Wellenlängenbereich von 600 - 650 nm am stärksten absorbiert. Das Absorptionsmaximum verschob sich dabei vom Start bis zur Beendigung der Reaktion kontinuierlich von 610 nm auf 640 nm. Aufgrund dieses Maximums konnte die Reaktionsdauer von Reaktion I ermittelt werden. Im initialen schnelleren Verlauf der Reaktion wurde im Abstand von 10 Minuten bei 640 nm die Extinktion gemessen, danach in stündlichen Abständen. Als Dauer von Reaktion I wurden 18 Stunden ermittelt. (Abb. 9: 4)

Reaktion II dauerte 60 Minuten. Hier lag das anfängliche Absorptionsmaximum bei 610 nm (1 Minute nach Beginn der Reaktion) und blieb nach 45 Minuten konstant bei einer Wellenlänge von 590 nm.

3.2.3. Spektrum bei LDH-M₄

Es wurden die gleichen Reaktionsansätze wie in 3.2.2. verwendet. Die LDH-Konzentration betrug 1,25 mg/ml in einer Lösung in 0,1 M Na-Phosphatpuffer pH 7. Davon wurden 0,5 ml in Meß- und Leerwert verwendet, mit denen das Spektrum erfaßt wurde. Die ermittelten Reaktionszeiten wurden bei diesem und den folgenden Versuchen mit LDH benutzt.

Das Spektrum des durch Natriumnitrit oxidierten Tryptophan-PDAB-Komplexes bei LDH zeigte im Wellenlängenbereich von 350 - 700 nm einen übereinstimmenden Kurvenverlauf mit dem des Reaktionsproduktes bei freiem Tryptophan (Abb. 6). Es hatte ein gut reproduzierbares Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 590 nm.

Die bei freiem Tryptophan und LDH-gebundenem Tryptophan übereinstimmenden maximalen Extinktionswerte bei 590 nm entsprachen dem von Spies und Chambers angegebenen Wert und konnten wegen ihrer verhältnismäßig geringen Streubreite zur Tryptophanbestimmung in dieser Arbeit ohne Vorbehalte angewendet werden.

3.2.4. Eichkurve und Tryptophangehalt von LDH-M₄

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Tryptophanbestimmung nach Spies und Chambers und zur Bestimmung des Tryptophangehaltes von LDH-M₄ wurden Eichkurven angefertigt. Dazu wurden Verdünnungsreihen von Tryptophan und LDH-M₄ hergestellt. Zunächst wurden bei der Erstellung einer Eichkurve die Ansatzverhältnisse, wie sie in den vorangehenden Versuchen bestanden, beibehalten. Der Konzentrationsbereich der Verdünnungsreihe von Tryptophan erstreckte sich von 0,1 bis 0,01 mg Tryptophan/ml Lösung, LDH-M₄ wurde von 1 mg/ml stufenweise auf 0,1 mg/ml Lösung verdünnt, bzw. in einer zweiten Reihe von 2,5 mg auf 0,25 mg LDH/ml Lösung.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden die Ansatzverhältnisse dahingehend modifiziert, daß sie den bei den Bestrahlungsversuchen entnommenen Probenmengen angeglichen waren. Statt den bisher pipettierten Mengen von 0,5 ml Tryptophan bzw. LDH-M₄ pro Ansatz, wurden jeweils 0,2 ml der unterschiedlich konzentrierten Lösungen genommen. Dadurch sollte, auf die Bestrahlungsversuche übertragen, verhindert werden, daß die Schichtdicke der bestrahlten Enzymlösung zu stark abnahm. Die Konzentrationen für diese Verdünnungsreihen umfaßten, wie zum Teil bei obigen Reihen, die Bereiche von 0,1 mg/ml - 0,01 mg/ml für Tryptophan und 1 mg/ml - 0,1 mg/ml für das Enzym.

Der Ansatz für den Meßwert hatte folgende Zusammensetzung:

Reaktion I: 2 ml H_2SO_4 (67 %)

6,64 μg PDAB

0,2 ml Trp- bzw. LDH-Lösung

Reaktion II: 0,05 ml NaNO_2 (0,04%)

Der Ansatz für den Leerwert wurde unter Weglassung von PDAB zubereitet. An den Konzentrationen für Schwefelsäure und Natriumnitrit wurde nichts geändert.

Die Eichkurven wurden aus den Konzentrationen von Tryptophan bzw. LDH-M_4 und den entsprechenden Extinktionswerten nach der Gleichung $y = mx + b$, wie in 3.1.4. angegeben, erstellt, gekoppelt mit einer Fehlerrechnung.

Abb. 7 zeigt die Eichkurven aus den Verdünnungsreihen mit 0,2 ml Probenlösung.

Der Tryptophangehalt, der aus den zwei mit verschiedenen Ansatzverhältnissen erstellten Eichkurven errechnet wurde, unterschied sich nur gering. Im ersten Fall, als 0,5 ml Tryptophan-bzw. LDH-M_4 -Lösungen in den Ansätzen verwendet wurden, ergab sich ein Tryptophangehalt von $23,4 \pm 0,4$ Molekülen pro Molekül LDH-M_4 . Aus den zweiten Eichkurven wurden $23,0 \pm 0,2$ Moleküle Tryptophan pro Molekül LDH-M_4 errechnet. Die Differenz ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß Rückstände in den Pipetten bei der geringeren Menge von 0,2 ml Lösung im Verhältnis mehr ins Gewicht fallen.

In der Literatur differieren die Angaben über den Tryptophangehalt von LDH-M_4 je nach verwendeter Bestimmungsmethode. Shelton und Rogers (19) geben bei LDH aus Kaninchen-skelettmuskel Tryptophanwerte von 3,2 - 4,0% was 21,8 - 27,4 Molekülen pro Molekül LDH entspricht.

Diese Autoren setzten dabei die Werte für Rinder-Lactatdehydrogenase (20) gleich der vom Kaninchen-skelettmuskel. Allgemein wird von Pesce et al (21) für alle Lactatdehydro-

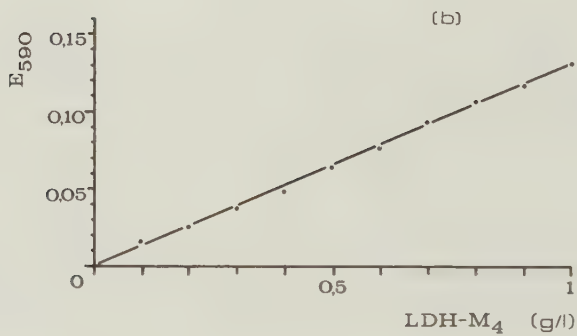
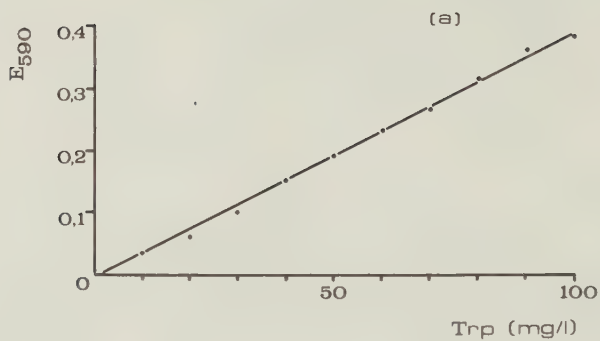


Abb. 7 (a) Eichkurve von Tryptophan bei E_{590}
(b) Eichkurve von LDH-M₄ bei E_{590}

genasen ein Gehalt von 22 ± 3 Molekülen Tryptophan angegeben, wobei die Bestimmung nach Spies und Chambers (12) als repräsentativ angenommen wurde. Der Tryptophangehalt von LDH-M₄ vom Kaninchen wird im Einzelnen nicht aufgeführt. Der von uns gefundene Wert von 23 Molekülen Tryptophan für LDH als Kaninchenskelettmuskel befindet sich in diesem Bereich.

3.3. Tryptophanbestimmung bei bestrahlter LDH-M₄

Der Abbau von Trp-Molekülen, der bei Einwirkung ionisierender Strahlen auf Trp-haltige Enzyme zu erwarten ist, wurde für LDH unter drei verschiedenen Gasbedingungen untersucht. Im Einzelnen wurde der Abbau von Trp und die strahleninduzierte Inaktivierung von LDH bei Stickstoff-, Stickoxydul- und Sauerstoffatmosphäre bestimmt.

Der dosisabhängige Aktivitätsverlust von bestrahlter LDH wurde mit Hilfe des enzymatischen Tests (siehe 2.2.4.) gemessen. Zur Registrierung des Extinktionsabfalles wurde das Optilab-System verwendet. Dabei war die Aktivitätsbestimmung mit einem mittleren Fehler von 3,5% behaftet.

Bestrahlt wurden jeweils 10 ml LDH-Lösung mit einer Enzymkonzentration von $1 \pm 0,1$ mg/ml. LDH war in 0,1 M Na-Phosphatpuffer pH 7 gelöst.

3.3.1. Tryptophanabbau bei Bestrahlung unter Stickstoff

Unter Stickstoff wurde LDH über einen Zeitraum von 120 Minuten bestrahlt, entsprechend einer Dosis von 260 krd. Von der LDH-Lösung wurden im Abstand von 20 Minuten Proben von 0,5 ml entnommen. In diesen Proben wurde die enzymatische Aktivität und der Trp-Gehalt nach Spies und Chambers (12) bestimmt, mit Reaktionsansätzen, wie in 3.2.4. aufgeführt.

Die Dosis-Effekt-Kurve zeigte einen exponentiellen Verlauf mit einer D_{37} von 151 krd. Die verbliebene Aktivität betrug nach einer Dosis von 260 krd noch 17,5%. Bei dieser noch vorhandenen Aktivität wurde ein Abbau von 4 Molekülen Tryptophan pro Molekül LDH-M₄ festgestellt.

Im Gegensatz zur Inaktivierung von LDH-M₄ zeigte die Zerstörung von Tryptophan bei der verwendeten Bestimmungsmethode keine exponentielle Abhängigkeit von der Dosis. Sie wies initial eine schnelle Phase auf, während gegen Ende der Bestrahlung nahezu kein Tryptophan mehr zerstört wurde. So war nach einer Dosis von 43 krd ein Verlust von 1,3 Molekülen Tryptophan pro Molekül LDH-M₄ eingetreten. Nach einer Dosis von 218 krd waren 4 der ursprünglich gemessenen 23 Moleküle Tryptophan in LDH-M₄ bei 260 krd 4,1 Moleküle Tryptophan in ihrer Struktur so verändert, daß sie nach Spies und Chambers als Verlust von Tryptophan erschienen.

In G-Werten ausgedrückt, bedeutet dies eine Ausbeute von 0,11 zerstörten Trp-Molekülen pro 100 eV nach einer Bestrahlung mit einer Dosis von 260 krd. Für die ersten 20 Minuten dieses Inaktivierungsvorganges wurden für die in dieser Zeit applizierten 43 krd 0,19 zerstörte Moleküle Tryptophan pro 100 eV errechnet, gegenüber 0,03 Molekülen Tryptophan pro 100 eV am Ende der Bestrahlung.

Die Kurve 1 in Abb. 8a zeigt die dosisabhängige Inaktivierung von LDH-M₄ bei Bestrahlung in stickstoffgesättigter Lösung, Kurve 1 in Abb. 8b den entsprechenden Abbau von Tryptophan-Molekülen pro Molekül LDH-M₄.

3.3.2. Tryptophanabbau bei Bestrahlung unter N₂O

Die Bestrahlung unter N₂O wurde über 60 Minuten mit einer entsprechenden Dosis von 130 krd durchgeführt. Es wurden wiederum 6 Proben zu 0,5 ml entnommen. Die in zehnminütigem Abstand abpipettierten Mengen wurden wie in 3.2.4. beschrieben aufgearbeitet.

Bei Bestrahlungsversuchen unter N_2O fand man, verglichen mit den Ergebnissen nach Bestrahlung unter N_2 , für den Aktivitätsverlust und auch für den Abbau von Tryptophan eine höhere Strahlenempfindlichkeit (Abb. 8a, 2 und Abb. 8b, 2). Es wurde für die Inaktivierung eine D_{37} von 74 krd gefunden, die verbliebene Aktivität nach der Dosis von 130 krd betrug noch 16 %, während sie unter N_2 bei dieser Dosis noch 42 % der Aktivität von unbestrahlter LDH- M_4 betrug.

Der dosisproportionale Kurvenverlauf des Verlustes von Tryptophan war ähnlich dem unter N_2 -Bestrahlung erzielten. Einer initial schnellen Phase des Abbaus folgte, wie unter N_2 , eine allmählich langsamere Phase. Im Ganzen gesehen, wurde aber mehr Tryptophan zerstört als unter den vorangegangenen Versuchsbedingungen. Nach 130 krd war ein Tryptophanverlust von 6,2 Molekülen Tryptophan pro Molekül LDH- M_4 festzustellen, entsprechend einem durchschnittlichen G-Wert von 0,3 Molekülen zerstörtes Tryptophan pro 100 eV. Für die initiale Phase wurde bei einer applizierten Dosis von 22 krd ein G-Wert von 1,05 Molekülen zerstörtes Tryptophan pro 100 eV errechnet, gegen Ende der Bestrahlung war der Wert auf 0,06 gesunken.

3.3.3. Tryptophanabbau bei Bestrahlung unter Luft

Die Gesamtdosis, die bei den Bestrahlungsversuchen unter Luftsauerstoff auf LDH- M_4 -Lösungen appliziert wurde, betrug 196 krd, entsprechend einer Bestrahlungszeit von 90 Minuten.

Proben zu 0,5 ml wurden in 15-minütigen Abständen entnommen, die Dosis nach 15 Minuten Bestrahlungszeit entsprach 32,7 krd.

Die Dosis-Effekt-Kurve (Abb. 8a, 3) für die Bestrahlungen unter Luft hatte im Vergleich zu den unter N_2 und N_2O

durchgeführten Versuchen einen flacheren Kurvenverlauf und somit den geringsten Aktivitätsverlust für LDH-M₄ unter den drei Bedingungen. Der Wert für die D₃₇ war dabei mit 176 krd fast um den Faktor 2,3 größer als beispielsweise bei Bestrahlung von N₂O-gesättigten Enzymlösungen.

Dagegen ergab sich für den Tryptophanabbau ein nahezu gegenteiliges Verhältnis (Abb. 8b, 3). Nach der nach obigen Bedingungen durchgeführten Bestrahlung waren 15 Moleküle der insgesamt 23 Tryptophan-Moleküle von LDH-M₄ zerstört. Außerdem ließ die strahlenabhängige Zerstörung von Tryptophan unter Luftsauerstoff im verwendeten Dosisbereich einen nahezu exponentiellen Verlauf erkennen, im Gegensatz zu den Zerstörungsvorgängen, wie sie unter N₂ und N₂O aufgezeigt wurden.

In nachfolgender Tabelle sind Inaktivierung von LDH-M₄ und die Tryptophanzerstörung unter den verschiedenen Atmosphären zusammengestellt.

Atmosphäre	G _(inakt) ^(a)	G _(-Trp) ^(b)	zerstörte Mol Trp ^(b) pro Mol LDH-M ₄
N ₂	0,029	0,13	2,5
N ₂ O	0,059	0,33	6,2
Luft	0,025	0,59	11,2

(a) G_(inakt): inaktivierte Moleküle LDH-M₄ pro 100 eV
(bezogen auf D₃₇)

(b) bei einer Dosis von 130 krd

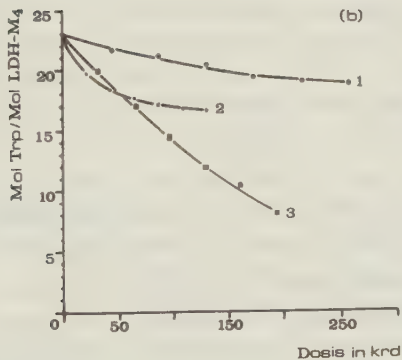
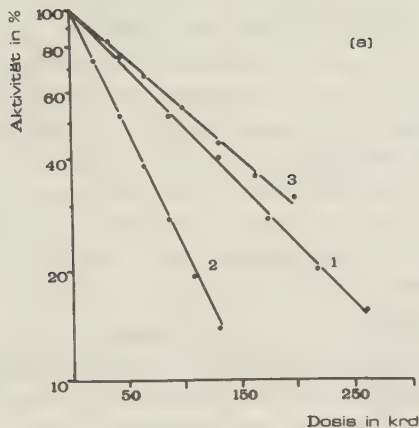


Abb. 8 (a) Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität von LDH-M₄ (Konzentration: $1 \pm 0,1$ mg/ml) von der Dosis.

(b) Tryptophanabbau bei LDH-M₄ in Abhängigkeit von der Dosis.

Kurve 1: in stickstoffgesättigter Lösung

Kurve 2: in N₂O-gesättigter Lösung

Kurve 3: in luftgesättigter Lösung

3.3.4. Abhängigkeit der Dauer von Reaktion I von der Dosis bei Bestrahlung unter Luft

Es wurde von der Tatsache ausgegangen, daß freies Trp schneller mit PDAB reagiert als proteingebundenes, weil wegen der hydrophoben Eigenschaften der überwiegende Teil des Trp im Inneren des Moleküls liegt. Bei einer strahlen-induzierten Umstrukturierung eines Proteins besteht die Wahrscheinlichkeit, daß innen lokalisiertes Trp an die Oberfläche des Moleküls gelangt und somit schneller mit Nachweisreagentien reagieren kann.

Wenn dieser Schluß zutraf, mußte Reaktion I (R I, siehe 3.2.1.) bei der Nachweismethode für Trp in Proteinen nach Spies und Chambers schneller verlaufen, abhängig vom Grad der Strukturveränderungen von bestrahlter LDH.

Diese Vorgänge wurden an LDH nachgeprüft; welche unter aeroben Bedingungen bestrahlt wurde. Unter diesen Versuchsvoraussetzungen ergaben sich die geringsten Schwierigkeiten und Zweifel an der uneingeschränkten Gültigkeit (siehe Diskussion) des Trp-Nachweises mit PDAB.

Die Versuche wurden mit den Analysenlösungen durchgeführt, wie sie in 3.2.4. für die Ansätze mit LDH beschrieben sind, die zeitliche Erfassung von R I erfolgte wie in 3.2.2.

R I wurde für Proben einer LDH-Lösung (Konzentration: 1 mg/ml) bestimmt, die insgesamt 90 Minuten (= 196,2 krd) bestrahlt wurde. Die Proben zu 0,5 ml wurden in 15-minütigen Abständen entnommen, Dosisschritten von 32,7 krd entsprechend.

Die Extinktion der Analysenansätze wurde bei 640 nm über einen Zeitraum von 18 Stunden gemessen. Dabei zeigte sich eine dosisabhängige lineare Verkürzung von Reaktion I bis zu einer Dosis von 130,7 krd. Bei dieser Dosis war Reaktion I nach einer Zeit von 240 ± 15 Minuten abgeschlossen, die gemessene Extinktion blieb über 18 Stunden konstant.

Die weiteren ausgemessenen Proben nach Dosen von 163 krd und 196 krd unterschieden sich mit 30 ± 5 Minuten und

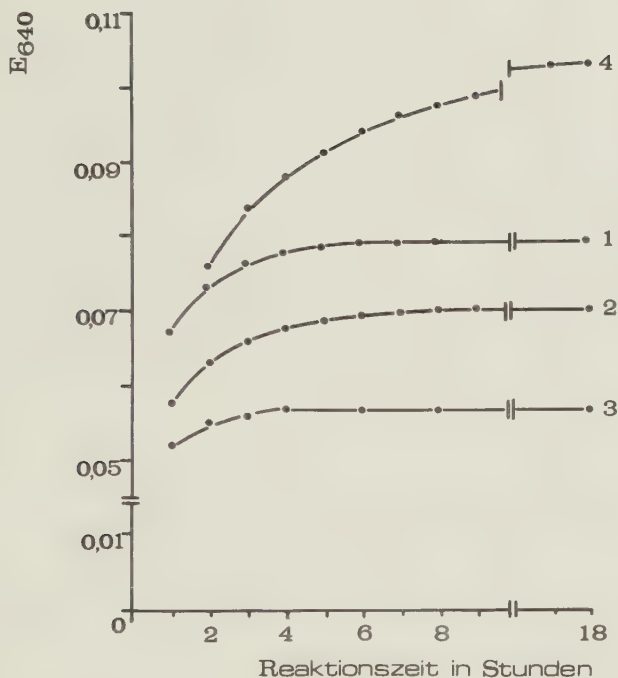


Abb. 9 Zeitabhängigkeit von Reaktion I bei nativer und bestrahlter LDH-M₄ (Dosis: 130 krd).

Kurve 1: bei stickstoffgesättigter Lösung

Kurve 2: bei N₂O-gesättigter Lösung

Kurve 3: bei luftgesättigter Lösung

Kurve 4: bei nativer LDH-M₄

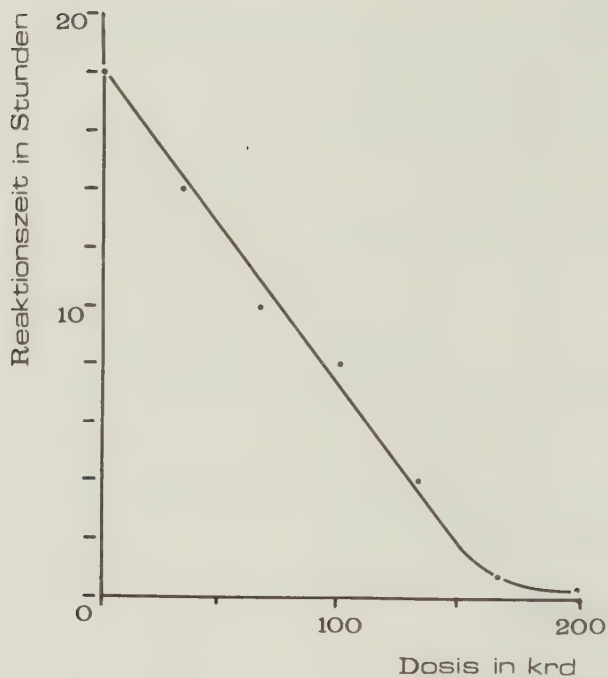


Abb. 10 Abhängigkeit der Dauer von Reaktion I von der Dosis in luftgesättigter Lösung von LDH-M₄.

17 $\pm$ 3 Minuten für Reaktion I nur noch gering. Es ist daher anzunehmen, daß in einem Dosisbereich von 170 - 190 krd alle noch nicht angegriffenen Tryptophan-Moleküle an der Oberfläche des LDH-Moleküls liegen, oder so lokalisiert sind, daß sie mit PDAB schnell reagieren können.

Die Dauer von Reaktion I für stickstoff- und N₂O- gesättigte LDH-Lösungen wurde bei einer Dosis von 130 krd bestimmt. Für stickstoffgesättigte Lösungen wurde eine Zeit von 360 $\pm$ 15 Minuten ermittelt, für N₂O- gesättigte Lösungen eine Zeit von 510 $\pm$ 15 Minuten.

Wie in Abb. 9 ersichtlich, ist die Reaktionsdauer bei der Bezugsdosis von 130 krd unter Sauerstoff am kürzesten und nimmt in der Reihenfolge Stickstoff, N₂O zu.

4. Diskussion

In dieser Arbeit sollte mit Hilfe der Aminosäure Trp das Ausmaß der molekularen Umstrukturierung bei bestrahlter LDH aufgezeigt werden, ähnlich wie in der Arbeit von E. Müller (8), in welcher die Fragestellung durch Bestimmung der reaktiven SH-Gruppen in LDH vor und nach verschiedenen Bestrahlungsbedingungen geklärt wurde.

Riboflavin-5'-phosphat, welches als Nachweisreagens für Trp benutzt werden sollte, bildet bei neutralem pH nach Annahme von Isenberg und Szent-Györgyi (16) mit Trp einen 1 : 1 - Komplex. Swinehart und Hess (10) konnten aufgrund dieser Tatsache eine Unterscheidung von "buried and exposed" Trp-Resten in α -Chymotrypsin vornehmen. Auf die vorliegende Arbeit übertragen, hätte das bedeutet, daß sich mit dieser Methode der Umfang der strahleninduzierten Auffaltung von LDH nachweisen läßt. Nach Bestrahlung mußten mehr der im nativen Enzym zum Großteil im Molekülinneren gelegenen hydrophoben Trp-Reste nachgewiesen und so der Denaturierungsgrad bestimmt werden können.

Gleichzeitig hätte man bei vollständiger Entfaltung, z.B. nach Einwirkung von SDS oder Säure, den strahleninduzierten Abbau von Tryptophan messen können.

Dieses Unterfangen scheiterte jedoch nicht zuletzt daran, daß die bei den Versuchen nach dieser Methode erforderliche LDH-Konzentration in einem Bereich hätte liegen müssen, der unseres Erachtens über die vorgegebenen Möglichkeiten hinausging. Um z.B. Extinktionen von 0,032 zu erhalten, wäre eine LDH-Lösung von 5,1 mg/ml nötig gewesen.

Für LDH-Konzentrationen von 1 mg/ml Lösung, wie sie bei den Bestrahlungsversuchen verwendet werden sollten, hätten sich Extinktionswerte von durchschnittlich 0,006 ergeben. Als weiter einschränkend war dabei die Tatsache zu bedenken, daß es mit relativ großen Fehlern verbunden gewesen wäre,

wenn bei den Bestrahlungsversuchen Proben von jeweils 1 ml entnommen worden wären.

Aus den Versuchen mit Riboflavin und Trp (3.1.2. und 3.1.4.) ergaben sich ferner erhebliche Schwankungen der Extinktionsmaxima, sowohl auf der Abszisse als auf der Ordinate, was bei den zu erwartenden geringen Extinktionswerten zu beträchtlichen Fehler geführt hätte, ersichtlich aus der Fehlerrechnung für die Eichkurve mit freiem Trp (3.1.4.). Bei der Errechnung der Geraden $y = mx + b$ ergab sich $m = 0,015$ mit $\Delta m = 0,001$ und $b = 0,015$ mit $\Delta b = 0,005$.

Da die gefundene Lichtempfindlichkeit (17) weitgehend ausgeschaltet werden konnte, wäre dieser Faktor für weitere Versuche ohne Bedeutung gewesen. Die bei der Bestimmung der Lichtempfindlichkeit erhaltenen Spektren des Riboflavin-Trp-Komplexes stimmten mit den von O. Warburg (22) gefundenen für Riboflavin und dem von "Lumiflavin", welches bei Lichteinwirkung auf Riboflavin entsteht, überein. Das Maximum bei 450 nm (Abb. 4) entspricht demnach dem im Spektrum von nichtkomplexgebundenem Riboflavin vorhandenem Maximum und prägt sich mit zunehmender Lichtexposition stärker aus. Das Absorptionsmaximum bei 500 nm, welches bei zunehmender Lichtexposition abnimmt, schreiben wir dem des Komplexes zu, der sich aus Trp und noch nicht verändertem Riboflavin bildet.

Welche Veränderung am Riboflavinmolekül im Einzelnen dafür verantwortlich ist, daß es mit Tryptophan nicht mehr zur Komplexbildung kommt, ist noch nicht vollständig geklärt. Nach einer Arbeit von Karrer et al (23) und Koschura (24) gilt es als gesichert, daß während der Photolyse von Riboflavin-5'-phosphat eine Oxidation an der Ribose stattfindet, welche nach Wada et al (25) zu einer Anzahl von verschiedenen Kohlenwasserstoffbruchstücken oder zur Abtrennung der ganzen Ribose führt. Von Halwer (26) wird angenommen, daß dabei als erster Schritt die Abspaltung eines Protons von der 2'-Hydroxylgruppe erfolgt und von N-9 des

Isoalloxazins ein Proton aufgenommen wird. Dadurch kommt es im Isoalloxazin-Ring zu einer Potentialumverteilung, und da nach Harburg und Foley (27) der Komplex zwischen Riboflavin-5'-phosphat und Trp durch Ladungsübertragung gebildet wird, ist anzunehmen, daß diese Übertragung nach Photolyse von Riboflavin-5'-phosphat nicht mehr zustande kommen kann.

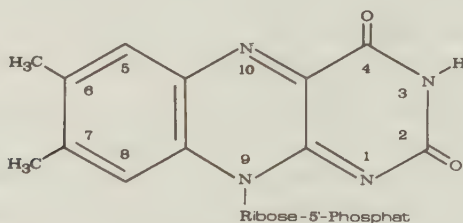


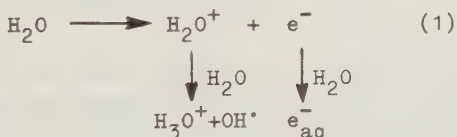
Abb. 11 Riboflavin-5'-phosphat

Die Versuche, die mit der Methode nach Spies und Chambers (12) zur Tryptophanbestimmung durchgeführt wurden, zeigten ein unterschiedliches Reaktionsverhalten von zerstörten Tryptophan-Molekülen im Verhältnis zur Inaktivierung von LDH unter verschiedenen Gasbedingungen.

Während die höchste Inaktivierungsrate bei Bestrahlung in N_2O -gesättigten LDH-Lösungen gefunden wurde, zeigte sich für Tryptophan die größte meßbare Zerstörung in luftgesättigten Lösungen. Vergleicht man die Inaktivierung von LDH unter den benutzten Gasbedingungen miteinander, so ist sie in Stickstoff und Luft etwa um die Hälfte kleiner als in N_2O . Bei N_2O zeigte sich ein Wert für $G_{(inakt)}$ von 0,059 bei N_2 und Luft unterscheiden sich die Werte nur geringfügig mit 0,029 bzw. 0,025.

In ihrer Arbeit mit Lysozym geben Aldrich und Cundall (4) für $G_{(\text{inakt})}$ Werte von 2,11 bei N_2O , 1,32 bei N_2 und 1,14 bei O_2 an. Weitere Autoren, die zum Teil D_{37} -Werte als Kriterium der Strahlenempfindlichkeit verwendeten, wiesen ebenfalls die schnellere Inaktivierung in N_2O -gesättigten Lösungen nach, wenngleich sich dabei von Enzym zu Enzym Differenzen inbezug auf die Beträge von $G_{(\text{inakt})}$ bzw. D_{37} ergaben, welche durch die strukturell begründete Reaktionsfähigkeit des aktiven Zentrums eines Enzyms mit Radiolyseprodukten des Wassers in wässrigen Lösungen zu erklären sind.

Aus der Radiochemie des Wassers ist ersichtlich, daß bei Bestrahlung unter N_2O die nach Gleichung (1) gebildeten solvatisierten Elektronen von N_2O weggefangen werden.



Dadurch entstehen nach Gleichung (2) aus den beim Inaktivierungsvorgang nicht beteiligten solvatisierten Elektronen (4) weitere $OH^\cdot$ -Radikale. Aufgrund der Arbeiten von Adams et al (8) und Aldrich und Cundall (4) kann angenommen werden, daß $OH^\cdot$ -Radikale 90% der Inaktivierung von Enzymen in neutralen Lösungen bewirken, die restliche Inaktivierung erfolgt durch $H^\cdot$ -Radikale. Solvatisierte Elektronen reagieren spezifisch mit Cystin und Cystein (26, 27, 28) unter Zerstörung dieser Aminosäuren, ohne daß dadurch der Inaktivierungsvorgang beeinflußt wird.

Durch Sauerstoff werden nach Gleichung (3) und (4) neben den solvatisierten Elektronen auch die $H^\cdot$ -Radikale dem

Inaktivierungsprozeß entzogen, während Stickstoff keinen Einfluß auf die Vorgänge der Radiolyse von Wasser hat, sondern dazu dient, störenden Sauerstoff zu verdrängen.



Es wird angenommen, daß die unter Sauerstoff entstehenden Radikale O_2^- und $\text{HO}_2^\bullet$ kaum (31) oder überhaupt nicht (4) an der Inaktivierung von Enzymen beteiligt sind. Unter Berücksichtigung der bei Bestrahlung unter N_2O , N_2 und O_2 vorherrschenden Verhältnisse der inaktivierenden Teilchen, ist ersichtlich, daß LDH unter N_2O am schnellsten inaktiviert wird und unter Sauerstoff ein gewisser Schutzeffekt auftritt.

Außer dem Inaktivierungseffekt durch Radikale, wäre noch die Annahme einer in N_2O -gesättigten Lösung bestehenden Wechselwirkung zwischen Proteinmolekülen und N_2O -Molekülen zu diskutieren, welche in gewissem Umfang zu einer erhöhten Sensibilisierung gegenüber Radikalen führen könnte (31).

Für die Zerstörung von Tryptophan erhielten wir mit der verwendeten Nachweismethode nach Spies und Chambers Werte, die sich nicht entsprechend der Inaktivierung von LDH unter den verschiedenen Gasbedingungen verhielten. In der initialen schnellen Phase der Tryptophanzerstörung traten die höchsten G-Wert für Trp unter N_2O auf, unter Luft waren sie etwa 40%, unter N_2 80% niedriger. Nach einer Dosis von 130 krd wies unter Luft bestrahlte LDH mit einem G-Wert von 0,59 für zerstörte Tryptophan-Moleküle pro 100 eV eine um rund 45% größere Zerstörung auf als unter N_2O , bzw. 80% gegenüber Stickstoff. Ähnliche Verhältnisse, mit der höchsten Zerstörung von Tryptophan unter Luft und der geringsten unter Stickstoff wurden bei Trypsin (32,6), Lysozym (4)

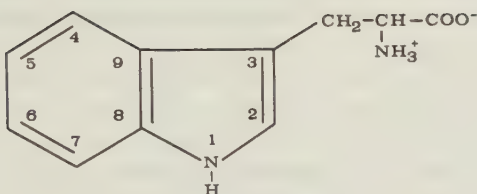
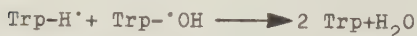


Abb. 12 Tryptophan

DNase I und DNase II (33) gefunden. Dabei ist zu erwähnen, daß in diesen Arbeiten die Tryptophanbestimmung ebenfalls nach Spies und Chambers erfolgte.

Armstrong und Swallow zeigten in ihrer Arbeit (34) die Vorgänge auf, die bei der Radiolyse von sauerstofffreiem Tryptophanlösungen stattfinden. Pulsradiolytisch gelang ihnen der Nachweis von Zwischenprodukten, die durch die Reaktion von e_{aq}^- , $H^\cdot$ und $OH^\cdot$ mit Tryptophan entstehen. Solvatisierte Elektronen reagieren mit einer Konstante von $k=3,0 \cdot 10^8 \cdot M^{-1} \cdot sec^{-1}$ bevorzugt am Stickstoffatom des Indolringes. Dieses Zwischenprodukt protoniert schnell unter Bildung von quartären Ammonium-Gruppen, was zu einem Verlust der Ringstabilität führt, oder durch intramolekulare Umverteilung zur 2-Position zu stabiler H-Anlagerung. OH-Radikale, die mit $k=1,25 \cdot 10^{10} \cdot M^{-1} \cdot sec^{-1}$ mit Tryptophan reagieren, führen zu Zwischenprodukten in Form von $OH^\cdot$ -Anlagerungen an Position 5 und 7, und verstärkt an der C_2-C_3 -Bindung, unter Bevorzugung von C_2 (35,36). Neben der erwähnten Aufhebung des primären Effektes der solvatisierten Elektronen, werden $H^\cdot$ -Radikale ($k=7,4 \cdot 10^9 \cdot M^{-1} \cdot sec^{-1}$) aufgrund der erhöhten selektiven elektrophilen Eigenschaften am Benzolring und an der 2-Position angelagert.

Über folgende vorgeschlagene Reaktionen kommt es zur Bildung von sogenannten stabilen Tryptophan-Bestrahlungsprodukten (Trp-H_2 und Trp-OH) und Rückbildung von Trp-Molekülen .



Bei niedrigeren Dosen (unter 300 krd) reagieren Trp-Radikale bevorzugt mit diesen stabilen Bestrahlungsprodukten, was nach Armstrong und Swallow (34) ineffektiver zur Rückbildung von Tryptophan beiträgt, aber sich dennoch in niedrigeren G-Werten ausdrückt, als bei obigen Reaktionen.

In N_2O -gesättigten Lösungen fallen die Reaktionen durch solvatisierte Elektronen weg. Es entstehen weniger reduzierte Tryptophanprodukte und unter Einbeziehung von Gleichung (2) mehr $\text{Trp-}^\cdot\text{OH}$ -Radikale. Weitere Reaktionen, die zur Rückbildung von Tryptophan führen, fallen dadurch weg, daß nach Armstrong und Swallow (34) aus Tryptophan-Molekülen mit zwei Hydroxylgruppen relativ stabiles Trp-OH gebildet wird. Es besteht nun die Frage in welchem Ausmaß solche Reaktionen von Tryptophan-Radikalen bei der Bestrahlung von Enzymen stattfinden können. In N_2 -gesättigten Enzymlösungen findet ferner nach Masuda et al (6) eine Verminderung der G-Werte für Tryptophan und Cystin statt durch die Reaktion zwischen den angelagerten OH-Radikal eines Tryptophan-Moleküls und dem solvatisierten Elektron von Cystin. Vergleiche von G-Werten anderer Autoren (6,31,35,30) und unseren gefundenen Werten mit denen von Armstrong und Swallow (34) lassen jedoch eine weitgehende Analogie der Vorgänge bei der Radio-lyse von freiem und proteingebundenem Tryptophan vermuten.

Da die weitaus meisten Untersuchungen über den Mechanismus der Radiolyse von freiem Tryptophan unter aeroben Bedingungen durchgeführt wurden, kann dieser als gesichert angenommen werden. Danach werden zwei Reaktionswege angenommen, deren erster gemeinsamer Schritt die Anlagerung von OH-Radikalen am C_2 -Atom ist (38,36). Über die nachfolgende Reaktion mit Sauerstoff oder HO_2 -Radikalen kommt es zur Ringöffnung, wobei die Reaktion mit Sauerstoff die wahrscheinlichere ist, da die Konzentration von HO_2 -Radikalen verhältnismäßig niedrig ist (4). Armstrong und Swallow (34) führen zusätzlich an, daß durch Sauerstoff Rückbildungsreaktionen vollständig unterdrückt werden. Dadurch ist die größere gemessene Zerstörung von Tryptophan-Molekülen unter aeroben Bestrahlungsbedingungen in verschiedenen Enzymen (4,6,32,33) und der bei unseren Versuchen verwendeten LDH-M₄ zu erklären. Von Aldrich und Cundall (4) wird vermerkt, daß diese Tatsache teilweise auch durch die fragliche Spezifität der Nachweismethode von Spies und Chambers für Tryptophan bestimmt wird. Gruen und Rivett (39) untersuchten die Spezifität dieser Bestimmungsmethode an einer Reihe von Tryptophanderivaten und anderen tryptophanähnlichen organischen Substanzen. Obwohl der Reaktionsmechanismus noch nicht genau geklärt ist, fanden sie, daß Modifikationen am Stickstoffatom des Indolringes, am C_2 -Atom, oder an beiden Positionen die Farbentwicklung mit PDAB verhindern. Bei einer Wellenlänge von 580 nm betrug der molare Extinktionskoeffizient lediglich 1,6% und 0,6% für 2-Hydroxy-Tryptophan bzw. 2-5- oder 2-7-Dihydroxy-Tryptophan gegenüber dem Wert von $\epsilon = 9\,600$ [Liter $\cdot$ Mol⁻¹ $\cdot$ cm⁻¹] für Tryptophan.

Da diese Tryptophanderivate bei der Reaktion mit OH-Radikalen überwiegend entstehen, kann der größte Teil der dadurch bedingten Radiolyse von Tryptophan, mit der Methode nach Spies und Chambers erfaßt werden. Ebenso imponieren

die Angriffe von solvatisierten Elektronen am Stickstoffatom des Indolringes und von H-Radikalen am C_2 -Atom als Tryptophanverlust. Veränderungen an anderen Positionen des Indolringes beeinflussen die Reaktion mit PDAB nicht wesentlich (39), abgesehen von elektronenanziehenden Gruppen, die eine negative Farbreaktion ergeben (40). Inwieweit Radikalanlagerungen an diese Positionen als Elektronenanzieher agieren oder die Reaktion mit PDAB stören, scheint nicht geklärt. Es muß also angenommen werden, daß in N_2 - und N_2O -gesättigten Lösungen das gesamte Ausmaß der Tryptophanzerstörung mit der Methode nach Spies und Chambers nicht erfaßt wird, da OH-Anlagerungen an 5- und 7-Stellung des Indolringes die Reaktion mit PDAB nicht verhindern. Quantitative Aussagen über das Ausmaß der Nichterfassung von derart radiolysiertem Tryptophan sind bisher nicht in der Literatur erschienen.

Unter aeroben Bedingungen wurde dieses Problem von Lynn und Orpen anChymotrypsin untersucht und mit verschiedenen Nachweismethoden weitgehend übereinstimmende Ergebnisse für die Tryptophanzerstörung erzielt (5). Zu den gleichen Erkenntnissen kam Lynn (31) bei Untersuchungen an Trypsin und Chymotrypsin in N_2O -gesättigten Lösungen, so daß angenommen werden darf, daß der Hauptangriff von Radikalen an den C_2 - und C_3 -Atomen und am Stickstoffatom des Indolringes erfolgt. Das würde bedeuten, daß die Tryptophanbestimmung nach Spies und Chambers mit kleinen Abstrichen zur Feststellung von strahleninduzierten Tryptophanverlusten in Proteinen verwendet werden kann.

Die Zerstörung von Tryptophan wird von Okada und Fletcher bei DNase I (41) in zwei Komponenten eingeteilt; in eine schnelle bei niedrigeren und eine langsamere bei höheren Dosen. Mit diesen Komponenten wurde die von ihnen erhaltenen Kurven erklärt. Ähnlich beurteilen Armstrong und Charlesby die Verhältnisse bei DNase II (33). Sie nehmen an,

daß einige Tryptophan-Moleküle an der Oberfläche des Enzyms liegen und deshalb schneller mit Radikalen reagieren, als solche, die sich im Inneren des Moleküls befinden. Ein ähnlicher Verlauf der Zerstörung von Tryptophan ergab sich bei unseren Versuchen mit LDH-M₄ bei stickstoff- und N₂O-gesättigten Lösungen. Bei der Bestrahlung von Enzymen finden dosisabhängige Strukturänderungen statt, auf die im Anschluß eingegangen werden soll, und die in groben Zügen aus der Verkürzung der Dauer von Reaktion I ersichtlich sind (siehe 3.3.4.). Danach ist zu erwarten, daß mit zunehmender Dosis mehr der im Inneren eines Enzyms gelegenen Tryptophan-Moleküle oberflächlich lokalisiert werden, und so einer vermehrten Radiolyse unterliegen. Es wäre deshalb zu erwarten, daß es zu einem annähernd exponentiellen Tryptophanabbau kommen müßte, wie es bei aerober Bestrahlung von LDH-M₄ im untersuchten Dosisbereich der Fall war.

Eine Interpretation der Kurven des Tryptophanverlustes durch die Ergebnisse, die für nicht enzymgebundenes Tryptophan erhalten wurden, erscheinen uns wahrscheinlicher. Wie bereits erwähnt, finden nach Armstrong und Swallow (34) bei der Radiolyse von Tryptophan unter anaeroben Bedingungen Rückbildungsreaktionen statt, die unter Stickstoff ausgeprägter sind als unter N₂O.

Bei niedrigen Dosen, wo der größte Tryptophanverlust in Enzymen gemessen wurde, stehen weniger der stärker reduzierten Tryptophan-Moleküle zu solchen Rückbildungsreaktionen zur Verfügung, als bei höheren Dosen, so daß dann ein geringerer Tryptophanverlust festgestellt wird. Daneben ist denkbar, daß auch aufgrund der zunehmenden Strukturänderung und der damit vermehrten Anzahl von exponierten Tryptophan-Molekülen, mehr Reaktionspartner für die Rückbildung von Tryptophan vorhanden sind und daraus eine Abnahme der Tryptophanzerstörung resultiert.

Durch die zeitliche Erfassung von Reaktion I (siehe 3.2.2. und 3.3.4.), wobei Proteine durch Schwefelsäure entfaltet werden und Tryptophan-Moleküle mit PDAB reagieren, kann außerdem eine Aussage über die Strukturveränderung von LDH bei Röntgenbestrahlung gemacht werden.

Im Vergleich mit der Inaktivierung von LDH-M₄ unter den verschiedenen Gasbedingungen, die in N₂O-gesättigten Lösungen am größten und bei Anwesenheit von Sauerstoff am geringsten ist, ist nach den in der Reihenfolge O₂, N₂, N₂O zunehmenden Reaktionszeiten mit PDAB anzunehmen, daß unter N₂O bestrahlte Lösungen die ausgeprägtesten Konformationsänderungen stattfinden. Die in verschiedenen Arbeiten (8,9,42,48) bei unter Stickstoff bestrahlter LDH-M₄ festgestellten Strukturveränderungen beruhen danach auf der Entfaltung des Enzyms mit Volumenvergrößerung und der Aggregation von Bestrahlungsprodukten des Moleküls, wobei die Aggregatbildung mit ansteigender Dosis zunimmt. Nach Dertinger und Jung (44) erfolgt die Aggregation durch die Reaktion von Radikalstellen an Bestrahlungsprodukten von Enzymen.



Niemczyk (42) fand in seiner Arbeit über die Natur der Bedingungen in strahleninduzierten Aggregaten von LDH-M₄ ein Überwiegen der elektrostatischen und hydrophoben Wechselwirkungen. Die bei der Radiolyse entstehenden Disulfidbrücken tragen nicht wesentlich zur Stabilisierung der LDH-Aggregate bei. Bei der von uns festgestellten Dauer von Reaktion I für native LDH von 18 Stunden und der Verkürzung der Reaktionszeit bei Bestrahlung unter Stickstoff und N₂O ist weiter anzunehmen, daß in nativer LDH stabilere Bindungsverhältnisse vorliegen als in Aggregaten. Dabei ist allerdings zu bedenken, daß durch die Radiolyse die native Struktur der LDH, bei der die Tryptophanreste im Innern liegen, aufgehoben wird, so daß hydrophobe Gruppen

sowohl in Aggregaten als auch in entfalteter LDH oberflächlich lokalisiert sein können und somit von vornherein schneller mit PDAB reagieren.

Durch Verlust der hydrophoben Eigenschaft bei der Reaktion mit Radikalen wird Tryptophan neben anderen Aminosäuren mit apolaren Gruppen, wie Phenylalanin, Leucin, Isoleucin, Valin oder Alanin aus hydrophoben Bindungen, die an der Bildung der Sekundärstruktur der Proteine beteiligt sind, entfernt (44). Es ist weiter denkbar, daß nicht strahlengeschädigte Tryptophan-Moleküle mit anderen nicht zerstörten hydrophoben Aminosäuren neue hydrophobe Bindungen eingehen und zur Bildung von Aggregaten beitragen. In aeroben Lösungen von Proteinen unterbleibt nach Dertinger und Jung (44) eine Aggregation durch die Bildung von Peroxyradikalen durch Sauerstoff



Danach ist anzunehmen, daß bei Anwesenheit von Sauerstoff lediglich eine Entfaltung oder Brüche von Peptidbindungen stattfindet. Wie gezeigt wurde, verläuft die Entfaltung bei LDH-M₄ zunächst bis etwa 130 krd linear und nähert sich dann vermutlich asymptotisch der Nulllinie.

Man hat feststellen können, daß bei Bestrahlungen unter N₂O eine sehr viel stärkere Aggregatbildung auftritt als unter N₂ (45,46), sodaß man annimmt, daß diese Aggregation durch OH-Radikale gefördert wird. Einen Hinweis dafür bietet auch der relativ langsame Verlauf von R I unter N₂O bestrahlten Lösungen im Vergleich zu Enzym, das unter Stickstoff bestrahlt wird. Die genauen Unterschiede der Aggregation bzw. Entfaltung unter den beiden Gasen wurde in dieser Arbeit nicht näher untersucht.

Die hier beschriebenen und diskutierten Ergebnisse konnten, unter Einbeziehung anderer Arbeiten, keine entscheidende Rolle des Tryptophan-Moleküls bei der Inaktivierung von

Ldh-M₄ und anderen Enzymen ergeben. Von einigen Autoren (4,31) wird dieser Aminosäure aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaft und der pulsradiolytisch festgestellten, initial fast ausschließlichen Reaktion mit H- und OH-Radikalen (4,6,32) eine große Bedeutung bei der Aufrechterhaltung der Sekundärstruktur beigemessen. Außerdem stellten Adams et al. (7) durch pulsradiolytische Messungen fest, daß OH'-Anlagerungen an aromatische und heterozyklische Aminosäuren die ersten Schritte zur Inaktivierung darstellen.

Wie Offinger bei LDH-M₄ (47) und Schüssler und Jung bei RNase (30) nachweisen konnten, zeigt der strahleninduzierte Abbau von Aminosäuren keine Korrelation zur Strahleninaktivierung der Enzyme. Es ist vielmehr vorstellbar, daß Strukturveränderungen, hervorgerufen durch Spaltung von Primär-, Sekundär-, oder Tertiärbindungen, das aktive Zentrum verändern, wodurch die katalytische Funktion abgebaut wird.

5. Zusammenfassung

LDH-M₄ wurde in wässriger Lösung unter N₂, N₂O und Luft mit einer Röntgenröhre bestrahlt und die dosisabhängige Inaktivierung bestimmt. Das Enzym zeigte in N₂O-gesättigter Lösung eine besonders hohe Strahlenempfindlichkeit, während es in aerober Lösung bei gleicher Dosis weniger stark inaktiviert wurde als unter N₂O oder N₂. Bei allen untersuchten Bestrahlungsbedingungen wurde eine Zerstörung der Tryptophanreste der LDH-M₄ durch die Radiolyse gefunden. Die Tryptophanbestimmung der bestrahlten Enzym Lösungen ergab aber in keinem Fall eine lineare oder exponentielle Abhängigkeit des Tryptophanabbaus von der Dosis. Teilweise muß diese Tatsache auf eine etwas zu geringe Spezifität der verwendeten Nachweismethode zurückgeführt werden. Zum größten Teil sind dafür Reparationsvorgänge des Tryptophans verantwortlich, die bei Anwesenheit der reduzierenden Radikale e_{aq}⁻ und H[•] verstärkt ablaufen.

Nach den erhaltenen Ergebnissen ist es unwahrscheinlich, daß zwischen Inaktivierung von LDH-M₄ und Tryptophanzerstörung ein direkter Zusammenhang besteht. Vielmehr muß ein komplexer Mechanismus angenommen werden, der zur Inaktivierung führt, und in den Tryptophan miteinzubeziehen ist.

Aufgrund der Messungen des zeitlichen Verlaufs der Reaktion des PDAB mit Tryptophan bei nativer und bestrahlter LDH ist es wahrscheinlich, daß eine Entfaltung des Proteins durch die Radiolyse hervorgerufen wird, die besonders nach Bestrahlung unter O₂ sehr ausgeprägt ist.

Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß die von Swinehart und Hess vorgeschlagene Methode zur Unterscheidung von "buried and exposed" Tryptophanmolekülen nicht für Untersuchungen an bestrahlten Proteinen geeignet ist.

6. Literaturverzeichnis

1. Alexander, P. und Lett, J. T.: Comprehensive Biochemistry, 27, 267 Amsterdam (1967) (herausgegeben von M. Florkin und E. H. Stotz)
2. Adelstein, S. J. und Mee, L. K.: Biochem. J. 80, 406 (1961)
3. Sanner, T. und Pihl, A.: Scand. J. clin. Lab. Invest. 22, 53 (1968)
4. Aldrich, J. E. und Cundall, R. B.: Int. J. Rad. Biol. 16, 343 (1969)
5. Lynn, K. R. und Orpen, G.: Rad. Res. 39, 15 (1969)
6. Masuda, T., Ovadia, J. und Grossweiner, L. I.: Int. J. Rad. Biol. 20, 447 (1971)
7. Adams, G. E., Willson, R. L., Bisby, R. H. und Cundall, R. B.: Int. J. Rad. Biol., 20, 405 (1971)
8. Müller, E.: Dissertation, Erlangen (1973)
9. Denkl, C. P.: Dissertation, Erlangen (1973)
10. Swinehart, J. H. und Hess, G. P.: Biochim. Biophys. Acta, 104, 205 (1965)
11. Spies, J. R. und Chambers, D. C.: Anal. Chem., 20, 30 (1948)
12. Spies, J. R. und Chambers, D. C.: Anal. Chem., 21, 1249 (1949)

13. Jaenicke, R. und Knof, S.: European J. Biochem. 4, 157 (1968)
14. Warburg, O. und Christian, W.: Biochem. Z. 286, 81 (1936)
15. Bergmeier, H. U.: Methoden der enzymatischen Analyse, Bd.I, Weinheim/Bergstraße, Verlag Chemie (1970)
16. Isenberg, I. und Szent-Györgyi: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 44, 857 (1958)
17. Demerre, L. J. und Brown, W. S.: Arch. Biochem. Biophys. 5, 181 (1944)
18. Blackburn, S.: Amino acid determination, Eward Arnold LTD, London; Marcel Dekker, INC., New York (1968)
19. Shelton, K. R. und Rogers, K. S.: Anal. Biochem. 44, 134 (1971)
20. Mc Kay, R. H. und Kaplan, N. O.: Biochim. Biophys. Acta 79, 273 (1964)
21. Pesce, A., Fondy, T. P., Stolzenbach, F., Castillo, F. und Kaplan, N. O.: J. Biol. Chem. 242, 2151 (1967)
22. Warburg, O.: Ergeb. Enzymforsch. 7, 210 (1938)
23. Karrer, P., Köbner, T. und Zehender, F.: Helv. Chim. Acta 19, 261 (1936)
24. Koschara, W.: Z. physiol. Chem. 229, 103 (1934)
25. Wada, T., Sakurai, Y. und Nikuni, Z.: J. Japan Soc. Food Nutrition 5, 97 (1953-1954) Chem. Abstr. 50, 16901a (1956)

26. Halwer, M.: J. Am. Chem. Soc. 73, 4870 (1951)
27. Harburg, H. A. und Foley, K. A.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 44, 662 (1958)
28. Braams, R.: Rad. Res. 27, 319 (1966)
29. Davies, J. V., Ebert, M. und Swallow, A. J.: Puls radi-
alysis, p. 165 (Ebert, M., Kune, J. P., Swallow, A. J.,
Baxendale, J. H.;Eds) London-New York: Academic Press
1965
30. Schüssler, H., Jung, H.: Z. Naturforsch. 226, 614 (1967)
31. Lynn, K. R.: Rad. Res. 51, 254 (1972)
32. Ovadia, J.: Israel J. Chem. 10, 1067 (1972)
33. Armstrong, R. C., Charlesby, A.: Int. J. Rad. Biol. 12,
523 (1967)
34. Armstrong, R. C., Swallow, A. J.:Rad. Res. 40, 563 (1969)
35. Duzhenkova, N. A., Parfenov, Y. D., Savich, A. V.,
Yartsev, E. I. Radiobiologiya 2, 662 (1962)
36. Peter, G., Rajewsky: Z. Naturforsch., 186, 110 (1963)
37. Swallow, A. J., Velandria, J. A.: Nature 195, 789 (1962)
38. Jaysom, G. G., Scholes, G., Weiss, J.: Biochem. J. 57,
386 (1954)
39. Gruen, L. C., Rivett, D. E.: Anal. Biochem. 44, 519
(1971)
40. Kupfer, D.: Anal. Biochem. 8, 75 (1964)

41. Okada, S. und Flecher, G. L.: Rad. Res. 15, 452 (1961)
42. Niemczyk, P.: Dissertation, Erlangen (1974)
43. Kunigk, K.: Dissertation, Erlangen (1973)
44. Dertinger, H., Jung, H.: Molekulare Strahlenbiologie;
Springer-Verlag; Berlin-Heidelberg-New York (1969)
45. Mee, L.K., Adelstein, S.J., und Stein, G.:
Radiat. Res. 52, 588 (1972)
46. Zahn, T.: Dissertation, Erlangen (1976)
47. Offinger, R.: Dissertation, Erlangen (1976)

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. H. Pauly für die Überlassung des Themas und die großzügige materielle Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit danken.

Frau Dr. H. Schüssler bin ich besonders dankbar für ihre wissenschaftliche Anleitung und ihren hilfsbereiten Rat.

Ferner möchte ich mich bei Herrn Dr. Milbers für die Durchführung der Dosimetrie bedanken.

Lebenslauf

Am 16. 7. 1948 wurde ich als Sohn des Elektromonteurs Willibald Metzger und seiner Ehefrau Rosa, geb. Leibl, in Agendorf, Kreis Straubing, geboren.

1954 wurde ich in Straubing eingeschult und besuchte ab 1958 das dortige Ludwigs-Gymnasium wo ich 1967 das Abitur ablegte.

Im selben Jahr wurde ich zur Bundeswehr eingezogen und vor Beendigung des Grundwehrdienstes krankheitshalber entlassen.

Im SS 1969 begann ich das Studium der Medizin an der Universität Erlangen-Nürnberg. Dort beendete ich das Studium im SS 1975 mit dem medizinischen Staatsexamen.

Erlangen, im Dezember 1975

Willibald Metzger

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen, Hauptstr. 109 (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990